

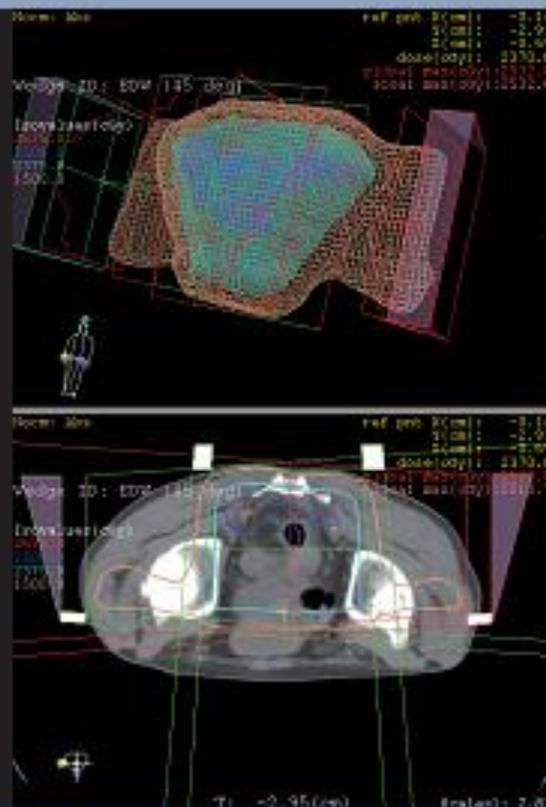


UNIVERSIDAD DE OVIEDO

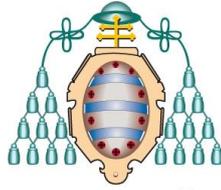
PROGRAMA DE DOCTORADO: INVESTIGACIÓN EN CIRUGÍA  
Y ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚRGICAS

## MARCADORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE EN EL CÁNCER DE RECTO LOCALMENTE AVANZADO

TESIS  
DOCTORAL



LUIS JOAQUÍN GARCÍA FLÓREZ  
2013



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

---

PROGRAMA DE DOCTORADO: INVESTIGACIÓN EN CIRUGÍA  
Y ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚRGICAS

## **TESIS DOCTORAL**

# **MARCADORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE EN EL CÁNCER DE RECTO LOCALMENTE AVANZADO**

LUIS JOAQUÍN GARCÍA FLÓREZ  
2013



## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Marcadores predictivos de respuesta al tratamiento neoadyuvante en el cáncer de recto localmente avanzado.	Inglés: Predictive markers of response to neoadjuvant therapy in locally advanced rectal cancer.
2.- Autor	
Nombre: Luis Joaquín García Flórez	-
Programa de Doctorado: Investigación en Cirugía y Especialidades Médico – Quirúrgicas	
Órgano responsable: Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas	

### RESUMEN (en español)

**INTRODUCCIÓN.** La radioterapia neoadyuvante con ó sin quimioterapia combinada se usa de forma habitual junto a la cirugía como tratamiento estándar del cáncer de recto (CR) localmente avanzado. Un 40-60% de estos pacientes experimentan algún grado de regresión tumoral, pero sólo un porcentaje menor tienen una respuesta patológica completa (pCR), que se asocia a mejor pronóstico. La predicción de la respuesta es de importancia porque el tratamiento se acompaña de efectos no deseados y es costoso. Sería muy beneficioso poder disponer de un panel de marcadores para ofrecer un tratamiento más personalizado. Los resultados de las investigaciones en este campo son conflictivos y poco concluyentes.

**HIPÓTESIS.** El tratamiento neoadyuvante se basa en la inhibición de la proliferación celular y la inducción de la apoptosis. La mayoría de los investigadores han centrado los estudios de marcadores predictivos de respuesta en moléculas que intervienen en la regulación del ciclo celular y la apoptosis, enzimas involucradas en el metabolismo de las fluoropirimidinas, oncogenes y genes supresores.

**OBJETIVOS.** 1. Relación entre la expresión de marcadores moleculares (HER2, BCL-2, APAF-1,  $\beta$ -catenina, VEGF, p53, Ki-67, COX-2, COL11A1) determinados con inmunohistoquímica (tissue microarrays) y la respuesta al tratamiento neoadyuvante en el CR localmente avanzado. 2. Relación entre marcadores clínicos y patológicos (Edad, sexo, CEA, localización, grado de diferenciación, intervalo hasta la cirugía, dosis de radioterapia) y la respuesta. 3. Relación entre la afectación ganglionar y la respuesta. 4. Valoración de un modelo de regresión logística para la predicción de la respuesta.

**MATERIAL Y MÉTODO.** 130 pacientes diagnosticados de CR localmente avanzado de tercio medio (57,7%) e inferior (42,3%) tratados con radioterapia (45-50,4 Gy) con ó sin quimioterapia concomitante y cirugía radical en un intervalo medio de 7,1 semanas después de la finalización del tratamiento neoadyuvante (rango 5-12). La edad media fue 67,4 años, 87 (67%) hombres y 43 (33%) mujeres. Se recogieron los datos clínico-patológicos y se determinaron por inmunohistoquímica y método semicuantitativo en las biopsias diagnósticas los marcadores moleculares. Los resultados se relacionaron con el grado de regresión tumoral (GRT) según el índice de Mandard y la disminución del estadio T (T-downstaging) en la pieza quirúrgica. Para el análisis univariante se utilizaron los test de chi cuadrado y correlación de Spearman (variables cualitativas) y el test de Mann-Whitney (variables cuantitativas). Para el estudio multivariante se usó un modelo de regresión logística. Se consideró significativa una p menor de 0,05.

**RESULTADOS.** La media de ganglios estudiados fue de 9,4 (rango 0-38). Se observó



pCR (GRT1) en 19 casos (14,6%) mientras que otros 18 (13,8%) presentaron sólo escasa enfermedad residual en la pared rectal (GRT2). Se registró T-downstaging en 63 pacientes (48,5%). Se diagnosticó afectación ganglionar (N+) preoperatoria en 77 pacientes (59,2%). La N+ postoperatoria se observó en 41 (31,5%), mientras que los 89 restantes fueron N0 (68,5%). De los 37 pacientes considerados como “respondedores” (GRT1 y 2), sólo hubo 4 (10,8%) con N+, y el resto (89,2%) N0. En el grupo de los “no respondedores” (GRT3, 4 y 5) se encontraron 37 casos N+ (39,8%) y 56 (60,2%) de N0 ( $p < 0,001$ ). Se encontró correlación significativa entre la expresión de BCL-2 ( $p = 0,005$ ),  $\beta$ -catenina ( $p = 0,027$ ), VEGF ( $p = 0,048$ ), APAF-1 ( $p = 0,03$ ), grado de diferenciación tumoral ( $p < 0,001$ ) y la respuesta (GRT) en el análisis univariante. El T-downstaging se asoció con la expresión de VEGF ( $p = 0,034$ ) y el grado de diferenciación tumoral ( $p < 0,001$ ). Con el resto de parámetros clínico-patológicos y moleculares no se encontró asociación. En el caso de la respuesta GRT, las variables introducidas en el modelo de regresión logística (análisis multivariante) como significativas han sido el grado de diferenciación tumoral y BCL-2.

**CONCLUSIONES.** 1. En el estudio univariante hemos encontrado relación entre la negatividad de la expresión de BCL-2,  $\beta$ -catenina, VEGF y APAF-1 y una mejor respuesta (GRT). También entre la negatividad de VEGF y una buena respuesta (T-downstaging). 2. No se hemos encontrado asociación entre los parámetros clínicos y patológicos estudiados y la respuesta (GRT y T-downstaging) a excepción del grado de diferenciación tumoral. 3. Existe asociación entre la afectación ganglionar y la respuesta. 4. En el análisis multivariante las variables significativas han sido el grado de diferenciación tumoral y BCL-2. Con este modelo se puede predecir en un 72% correctamente la respuesta al tratamiento neoadyuvante.

## RESUMEN (en Inglés)

**BACKGROUND.** Neoadjuvant radiotherapy with or without combined chemotherapy before radical surgery is the standard treatment in locally advanced rectal cancer (RC). About 40-60% of patients will experience some extent of tumor regression, but only a minor proportion will have a pathologic complete response (pCR), that is associated to a better prognosis. Prediction of response is important because treatment has side effects and is costly. It would be beneficial to have a panel of markers in order to offer a personalized treatment. Research results are conflictive and inconclusive.

**HYPOTHESIS.** Neoadjuvant therapy is based in cell proliferation inhibition and apoptosis induction. The majority of researchers have based the predictive to response markers analysis in molecules involved in cell cycle regulation and apoptosis, enzymes involved in fluoropyrimidin metabolism, oncogenes and suppressor genes.

**OBJECTIVES.** 1. Relation between expression of molecular markers (HER2, BCL-2, APAF-1,  $\beta$ -catenin, VEGF, p53, Ki-67, COX-2, COL11A1) determined by immunohistochemistry (tissue microarrays) and response to neoadjuvant therapy in locally advanced RC. 2. Association between clinical and pathological markers (age, gender, tumor location, CEA, histologic grade, radiotherapy dose) and response. 3. Relation between lymph node status and response. 4. Evaluation of a regression logistic model for the prediction of response.

**MATERIAL AND METHOD.** 130 patients with locally advanced RC of mid (57.7%) and low third (42.3%) rectum, treated with radiotherapy (45-50.4 Gy) with or without combined chemotherapy and radical surgery in a mean interval of 7.1 weeks (range 5-12) before the end of the neoadjuvant therapy. Mean age was 67,4 years, 87 (67%) were males and 43 (33%) females. Clinical and pathological data were collected. Paraffin-embedded sections obtained in diagnostic biopsies before therapy were assessed by immunohistochemical staining for molecular markers and classified using a semi-quantitative method. The results were related with T-downstaging and tumor



regression grade (TRG) using Mandard's scoring system on surgical specimens. Chi-square, Spearman's correlation tests (qualitative variables) and Mann-Whitney test (quantitative variables) were used in the univariant analysis. For the multivariant analysis a regression logistic model was used. A p below 0.05 was considered significant.

**RESULTS.** The mean of lymph node retrieval in the surgical specimens was 9.4 (range 0-38). In 19 patients (14.6%) pCR (TRG1) was observed, whilst in another 18 (13.8%) only few residual disease was seen in the rectal wall (TRG2). T-downstaging was observed in 63 patients (48.5%) and progression of tumor stage was seen only in one case. Preoperative lymph node involvement (N+) was diagnosed in 77 patients (59.2%). Postoperative N+ was observed in 41 patients (31.5%), and the other 89 were N0 (68.5%). In the 37 patients considered as "responders" (TRG1-2), there were only 4 (10.8%) with N+, and the rest (89.2%) were N0. In the "non responders" group (TRG3-4-5) 37 cases were N+ (39.8%) and 56 (60.2%) were N0 ( $p < 0.001$ ). Regarding predictive markers of response, there was significant correlation between the expression of BCL-2 ( $p = 0.005$ ),  $\beta$ -catenin ( $p = 0.027$ ), VEGF ( $p = 0.048$ ), APAF-1 ( $p = 0.03$ ), histologic grade ( $p < 0.001$ ) and response (TRG) in the univariant analysis. T-downstaging was associated with VEGF expression ( $p = 0.034$ ) and histologic grade ( $p < 0.001$ ). With the other clinical, pathological and molecular markers no correlation was found. Regarding TRG, the significant parameters in the multivariant analysis were histologic grade and BCL-2 expression.

**CONCLUSIONS.** 1. We have found relation between negativity in the expression of BCL-2,  $\beta$ -catenin, VEGF and APAF-1 and good response (TRG) in the univariant analysis. Also between negativity of VEGF and good response (T-downstaging). 2. We did not find any association between clinical and pathological parameters and response, excepting histologic grade. 3. There is association between lymph node involvement and response. 4. In the multivariant analysis, significant variables were BCL-2 and histologic grade. With this regression logistic model we can predict the response to neoadjuvant therapy with a 72% of accuracy.

**SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚRGICAS**  
**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚRGICAS**

*“Although the proportion of cases of cancer of the rectum cured by radium is not high, it is most important that we should keep on reminding ourselves that some cases have been definitively cured. We have before us living witness of this fact, and it will be an unpardonable mistake if we allowed it to be forgotten.”*

*Cuthbert Dukes (Proc Royal Soc Med. March 13, 1935)*



*A Lali, Marta, Juan, mis padres y hermanos.*



## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis doctoral supone la culminación de un intenso trabajo de investigación en el que han participado un gran número de colaboradores. Quiero expresar mi agradecimiento en primer lugar a los directores de la tesis, Manuel Florentino Fresno Forcelledo y Guillermo Gómez Álvarez, por su orientación y espíritu crítico en todas las fases del desarrollo de este estudio.

A Ana Madalina Frunza por su interés y dedicación especialmente en lo referente al análisis de microscopia en colaboración con Carmen Martínez Alonso.

A Ángela García González por su apoyo en el diseño, manejo informático y estadístico de los datos.

A Luis Barneo Serra por su entusiasmo investigador y colaboración.

A José Fernández por su ayuda para el análisis e interpretación de los resultados del estudio estadístico.

A los técnicos del Biobanco del Hospital Universitario Central de Asturias por la elaboración de los tissue microarrays y a los de la Sección de Inmunohistoquímica del Servicio de Anatomía Patológica por su colaboración en el estudio.

A Sebastián Menéndez Salinas por la revisión del estilo y el diseño de la cubierta.

A mis compañeros del Servicio Cirugía General del Hospital San Agustín por facilitar el desarrollo de esta investigación.



## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTOS Y ESTADO ACTUAL</b> .....	<b>17</b>
3.1	GRUPOS DE RIESGO EN EL CÁNCER DE RECTO .....	19
3.1.1	<i>Riesgo bajo</i> .....	20
3.1.2	<i>Riesgo intermedio</i> .....	21
3.1.3	<i>Riesgo alto</i> .....	21
3.2	PRINCIPIOS GENERALES DE RADIOQUIMIOSENSIBILIDAD .....	21
3.3	VALORACIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO .....	22
3.4	DEFINICIÓN DE BIOMARCADORES .....	24
3.5	MARCADORES PRONÓSTICOS EN EL CÁNCER DE RECTO .....	26
3.5.1	<i>Estudios de imagen</i> .....	26
3.5.2	<i>Estudios histopatológicos</i> .....	26
3.5.3	<i>Marcadores moleculares</i> .....	27
3.6	MARCADORES PREDICTIVOS EN EL CÁNCER DE RECTO .....	27
3.6.1	<i>Estudios genómicos</i> .....	28
3.6.1.1	Análisis generales del genoma .....	28
3.6.1.1.1	Perfiles de expresión genética .....	28
3.6.1.1.2	Aberraciones cromosómicas .....	29
3.6.1.2	Análisis de biomarcadores .....	30
3.6.1.2.1	Mutaciones del ADN en la vía RAS-MAPK .....	30
3.6.1.2.2	Polimorfismos de nucleótido único .....	31
3.6.1.2.3	Otros estudios.....	32
3.6.2	<i>Estudios proteómicos</i> .....	33
3.6.3	<i>Estudios de inmunohistoquímica (tissue microarrays)</i> .....	34
3.6.3.1	Reguladores del ciclo celular.....	34
3.6.3.2	Marcadores de proliferación e índice mitótico.....	35
3.6.3.3	Marcadores de apoptosis.....	36
3.6.3.4	Angiogénesis e hipoxia.....	38
3.6.3.5	Otros marcadores.....	40
3.6.3.6	Matriz extracelular .....	42
3.6.4	<i>Marcadores clínico-patológicos y estudios de imagen</i> .....	43
3.6.4.1	Estudios de imagen.....	43
3.6.4.2	Síntomas clínicos .....	44
3.6.4.3	Antígeno carcinoembrionario (CEA) .....	44
<b>4</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>47</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>51</b>

<b>6</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODO .....</b>	<b>55</b>
6.1	SUJETOS OBJETO DE ESTUDIO.....	57
6.1.1	<i>Criterios de inclusión</i> .....	57
6.1.2	<i>Criterios de exclusión</i> .....	57
6.2	PROTOCOLO DE TRATAMIENTO .....	60
6.2.1	<i>Estudios de extensión</i> .....	60
6.2.2	<i>Tratamiento neoadyuvante</i> .....	60
6.2.2.1	Radioterapia.....	60
6.2.2.1.1	Simulación.....	60
6.2.2.1.2	Planificación.....	60
6.2.2.1.3	Dosis .....	61
6.2.2.1.4	Técnica de irradiación.....	62
6.2.2.2	Quimioterapia.....	62
6.2.3	<i>Tratamiento quirúrgico</i> .....	63
6.3	PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS .....	64
6.4	PARÁMETROS MOLECULARES (BIOMARCADORES).....	64
6.5	EXPRESIÓN GÉNICA. ESTUDIO DE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	65
6.5.1	<i>Técnica de tissue microarrays</i> .....	65
6.5.2	<i>Anticuerpos</i> .....	67
6.5.3	<i>Valoración de los resultados inmunohistoquímicos</i> .....	68
6.6	VALORACIÓN HISTOLÓGICA DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE ...	71
6.7	ESTUDIO ESTADÍSTICO .....	74
<b>7</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>75</b>
7.1	PACIENTES, CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y DEL TRATAMIENTO .....	77
7.2	ESTUDIO DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO NEOADYUVANTE .....	79
7.3	ESTUDIOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	81
7.4	BIOMARCADORES MOLECULARES Y RESPUESTA (GRT) .....	82
7.5	BIOMARCADORES MOLECULARES Y RESPUESTA (T-DOWNSTAGING) .....	87
7.6	CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y RESPUESTA (GRT).....	92
7.7	CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y RESPUESTA (T-DOWNSTAGING).....	95
7.8	AFECTACIÓN GANGLIONAR Y RESPUESTA (GRT).....	98
7.9	ANÁLISIS MULTIVARIANTE.....	100
<b>8</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>103</b>
8.1	NEOADYUVANCIA Y RESPUESTA COMPLETA .....	106
8.2	MARCADORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS Y RESPUESTA .....	109
8.3	MARCADORES MOLECULARES Y RESPUESTA .....	112
8.4	AFECTACIÓN GANGLIONAR Y RESPUESTA.....	121
8.5	PERSPECTIVAS FUTURAS .....	122

<b>9</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>125</b>
<b>10</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>129</b>
<b>11</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>151</b>



# 1 ABREVIATURAS

cCR: Respuesta clínica completa

CCR: Cáncer colo-rectal

CEA: Antígeno carcinoembrionario

CR: Cáncer de recto

CRM: Margen de resección circunferencial

IHQ: Inmunohistoquímica

pCR: Respuesta patológica completa

PET: Tomografía por emisión de positrones

QT: Quimioterapia

RL: Recurrencia local

RM: Resonancia magnética

RQT: Radioquimioterapia

RT: Radioterapia

TC: Tomografía computerizada

TME: Escisión total del mesorrecto

5-FU: 5-fluorouracilo



## **2 INTRODUCCIÓN**



El cáncer colorrectal (CCR) es a nivel mundial el tercero más frecuente en los hombres (663.000 casos, un 10% del total) y el segundo en mujeres (571.000 casos, 9,4% del total). Casi el 60% se diagnostica en países desarrollados. Se estiman más de 600.000 muertes anuales por CCR, un 8% del total de muertes por cáncer, siendo la cuarta causa de muerte por cáncer más frecuente en el mundo<sup>1</sup>. En Europa, donde se diagnosticaron unos 436.000 nuevos casos de CCR en 2008 (13,6% del total de cánceres), fue la segunda causa de muerte por cáncer más frecuente (212.000 muertes, 12,3%)<sup>2</sup>. En España se diagnostican cada año unos 22.000 nuevos casos de CCR, con más de 13.000 muertes anuales por esta enfermedad<sup>3</sup>. Alrededor de un 70% se localizan en el colon y un 30% en el recto.

Las estrategias terapéuticas en el cáncer de recto (CR) han evolucionado de manera significativa en las últimas décadas. Un avance importante supusieron los estudios de *Heald et al* para la implantación de la escisión total del mesorrecto (TME) como técnica quirúrgica estándar en el CR<sup>4</sup>. En lo referente al tratamiento complementario, los grupos cooperativos del *Gastrointestinal Study Group* (GITSG), *North Central Cancer Treatment Group* (NCCTG) y *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project* (NSABP) desarrollaron estudios clínicos randomizados en los años 80 y 90 que demostraron una mejora del control local y supervivencia con la quimioterapia (QT) y radioterapia (RT) adyuvante<sup>5, 6</sup>. El estudio sueco del *Swedish Rectal Cancer Trial Group* fue el primero en demostrar el beneficio en supervivencia y control local con la RT preoperatoria (ciclo corto) comparada con la cirugía sola<sup>7</sup>. Posteriormente, el beneficio de la RT preoperatoria combinada con la TME fue demostrada en el estudio holandés 95-04 del *Dutch Commissie Klinisch Vergelijkend Onderzoek* (CKVO)<sup>8</sup>. La recurrencia local (RL) a los 5 años con TME era del 12% y bajó al 6% con la RT neoadyuvante. Un metaanálisis de 22 estudios controlados y randomizados muestra que la RT preoperatoria disminuye significativamente la RL<sup>9</sup>. El estudio alemán de referencia CAO/ARO/AIO-94 desarrollado por el *German Rectal Cancer Study Group* demostró un superior control local, menor toxicidad y mayor tasa de preservación esfinteriana con neoadyuvancia comparada con la adyuvancia basada en 5-FU<sup>10</sup>. Otros estudios indican que la adición de radioquimioterapia (RQT) preoperatoria ha demostrado ser beneficiosa en relación a RL aunque las tasas de supervivencia son similares<sup>11, 12, 13, 14</sup>. El estudio EORTC 22921 concluyó que la QT,

independientemente de cuándo sea administrada, mejora de forma significativa el control local<sup>11</sup>.

La TME mejora el control local y la supervivencia respecto a la cirugía convencional<sup>15, 16</sup>. A pesar de ello, esta cirugía tiene una morbilidad significativa<sup>17</sup>. Así como la cirugía laparoscópica del colon ha demostrado unos resultados oncológicos a largo plazo similares a la cirugía abierta<sup>18, 19</sup>, su uso en el recto todavía no puede considerarse estándar<sup>20</sup>. Incluso están descritos unos datos mayores de márgenes positivos<sup>21</sup>, en parte ocasionados por la imposibilidad de palpar los límites del tumor. Otras publicaciones han demostrado las ventajas conocidas del uso de las técnicas laparoscópicas con buenos resultados oncológicos<sup>22, 23</sup>.

En base a los resultados de estos estudios, en la última década la RT neoadyuvante con ó sin QT combinada ha sido usada de forma cada vez más habitual junto a la cirugía como tratamiento estándar del CR en estadios II y III.

## **3 FUNDAMENTOS Y ESTADO ACTUAL**



El tratamiento neoadyuvante de RQT mejora el control local y reduce la toxicidad respecto al tratamiento postoperatorio. *Sauer et al*<sup>10</sup> ya demostraron en 2004 que la RQT preoperatoria es superior a la postoperatoria en términos de RL y toxicidad aguda (6 vs 13% y 27 vs 40%). Aproximadamente un 40-60% de estos pacientes experimentan algún grado de regresión tumoral, pero sólo un porcentaje menor de ellos tiene una respuesta patológica completa (pCR)<sup>24</sup>. La pCR caracterizada como la total desaparición microscópica de células tumorales se considera uno de los mejores marcadores de un buen pronóstico<sup>25,26</sup>. En un 5-30% de casos está descrita una pCR, mientras que en la mayoría de los pacientes habrá cierto grado de enfermedad residual después del tratamiento neoadyuvante. Estas diferencias se podrían explicar en parte por los distintos tamaños tumorales y las diferencias biológicas de cada lesión. El tratamiento preoperatorio no aumenta la morbi-mortalidad de la cirugía de forma significativa, pero no es un tratamiento inocuo a largo plazo, pudiendo afectar a la función del esfínter anal<sup>27</sup>, a las funciones sexuales en ambos sexos<sup>28</sup>, alteraciones intestinales<sup>29</sup> y aumento de segundos tumores<sup>30</sup>. A pesar de los recientes avances en los tratamientos multimodales, las tasas globales de recurrencia tumoral, morbilidad y mortalidad siguen siendo altas. En concreto la morbilidad asociada a su tratamiento es significativa, incluyendo diarrea, disuria, toxicidad hematológica ó la necesidad de una colostomía permanente. El tratamiento ideal para el CR aún no ha sido desarrollado. Es más, la respuesta individual a la radiación es muy variada y no se ha establecido todavía un indicador fiable de respuesta al tratamiento neoadyuvante. La predicción de esta respuesta es de particular importancia porque el tratamiento se acompaña de efectos no deseados y es costoso.

### 3.1 Grupos de riesgo en el cáncer de recto

Basado en el estadio TNM, el CR se puede clasificar en tres grupos: bajo riesgo (el “bueno”), intermedio (el “malo”) y alto riesgo (el “feo”). Cada grupo requiere un enfoque terapéutico distinto basado en el riesgo de desarrollar metástasis<sup>31,32</sup>. Las mejoras en la identificación de marcadores pronósticos y predictivos específicos de cada grupo deben ayudarnos a simplificar las decisiones terapéuticas. La popularización de la técnica de TME en los años 90 permitió disminuir las tasas de RL

desde más del 20% hasta alrededor del 10%<sup>33</sup>. La adición de RT preoperatoria tiene un efecto beneficioso en control local y, en ocasiones, en preservación esfinteriana<sup>8, 12, 32, 34</sup>. A pesar de que el beneficio de la adición de QT preoperatoria no está del todo demostrado para algunos, en muchos países el tratamiento estándar del CR localmente avanzado es la RQT preoperatoria. La incidencia del desarrollo de metástasis a distancia actualmente del CR localmente avanzado es del 30-40%.

### 3.1.1 Riesgo bajo

Son CR en estadios T1-T2, sin afectación ganglionar (N0) que después de TME sin otros tratamientos complementarios tienen unas tasas de RL muy bajas y altas tasas de curación<sup>35, 36</sup>. Otras opciones más controvertidas en relación a la preservación del recto y la mejora de la calidad de vida son las técnicas de resección local (TEM, TAMIS, etc) con neoadyuvancia previa ó RQT seguida de una política de esperar y ver (*wait and see*) en caso de respuesta clínica completa (cCR)<sup>37, 38</sup>. La cuestión es si estas opciones son seguras con tasas de RL del 5-28% en T1 y 11-45% en T2, y además la afectación ganglionar no puede ser determinada de forma segura por resonancia magnética (RM). Criterios pronósticos adicionales de baja incidencia de afectación ganglionar (N+) serían el estadio pT1, grados de diferenciación I-II y la ausencia de invasión vascular<sup>39</sup>. Estos tumores tienen un riesgo de afectación ganglionar en torno al 6%, pero la mayoría de los CR no cumple estos criterios. En los casos de tumores relativamente pequeños (T1-3) donde el riesgo de afectación ganglionar sea mayor, la RQT preoperatoria seguida de cirugía local tipo TEM podría ser una opción en casos seleccionados.

La política de *wait and see* ha sido propuesta por el grupo brasileño de *Habr-Gama*. En el caso de cCR los pacientes son sometidos a un seguimiento intensivo. Los resultados recientes ofrecen unas tasas a los 5 años del 95% de supervivencia libre de enfermedad y 100% de supervivencia global<sup>40</sup>. El problema es que posiblemente sólo el 25-50% de estos pacientes con cCR tengan una pCR<sup>36</sup>.

En aras a implementar estas opciones terapéuticas necesitamos marcadores pronósticos adecuados para identificar pacientes de bajo riesgo y marcadores predictivos para seleccionar pacientes que respondan bien a la RQT.

### 3.1.2 Riesgo intermedio

En general, los tumores de riesgo intermedio son CR en estadios T3N0 grandes y T1-3N1 que se tratarán con RT ó RQT preoperatoria seguidos de TME. La elección de RT preoperatoria de ciclo corto ó RQT es todavía motivo de debate. Dos estudios randomizados comparando ambas opciones tienen poca potencia para evaluar el efecto del control local. Las complicaciones tempranas son menores en el grupo de RT de ciclo corto pero no hay diferencias entre ambos grupos en complicaciones tardías, calidad de vida y supervivencia a 4 años<sup>41, 42</sup>.

### 3.1.3 Riesgo alto

Los CR con alto riesgo de RL y a distancia son tumores T4 ó con extensa afectación ganglionar. Se puede mejorar la supervivencia aplicando terapias dirigidas con potencial radiosensibilizante. Los resultados de estudios fase I-II con cetuximab han sido decepcionantes, no alcanzando tasas de pCR superiores al 5-10%. Está demostrada la eficacia del bevacizumab en el CCR metastásico. Los resultados iniciales en el CR son más prometedores con pCR del 15% y tendencia a mejoras en la supervivencia a 5 años<sup>43</sup>.

## 3.2 Principios generales de radioquimiosensibilidad

El tratamiento radioterápico se basa en la inhibición de la proliferación celular y la inducción de la apoptosis<sup>44</sup>. Entre varios mecanismos de acción, la radiación ionizante origina daños en el ADN de forma directa ó mediante la producción de radicales libres. Aunque algunas lesiones pueden ser reparadas, otras pueden derivar a mutaciones letales para la célula. El fármaco más comúnmente usado en la terapia neoadyuvante del CR es el 5-fluorouracilo (5-FU), un antagonista de las pirimidinas de estructura similar a la timina y el uracilo. Inhibe la síntesis del ADN bloqueando la síntesis de nucleótidos por inhibición enzimática y por otros mecanismos. También interfiere en la producción de ARN.

Los efectos locales predominantes son principalmente derivados de la irradiación, mientras que la QT concomitante serviría como un radiosensibilizante. Los efectos de la RQT son básicamente el resultado del daño del ADN. Sin embargo, la respuesta a la RQT es muy variable. En general, se admiten cuatro explicaciones para estas diferentes sensibilidades de los tumores sólidos<sup>45</sup>:

1. Los tumores con mala respuesta frecuentemente presentan un alto contenido de células hipóxicas y/o alteraciones en la reoxigenación durante los tratamientos fraccionados. Este hecho predomina en tumores de mayor volumen.
2. Es bien conocido que las células que se encuentran en los segmentos proliferantes del ciclo celular son más sensibles. Por tanto se considera que los tumores más proliferantes deben producir mayor proporción de pérdida celular en comparación con tejidos normales<sup>46</sup>.
3. Existen distintos niveles de capacidad de reparación del daño del ADN. En otras palabras, los tumores menos curables tienen un alto potencial de recuperación del daño del ADN.
4. Parece haber una radioquimiosensibilidad inherente asociada a la sensibilidad genética de cada paciente. Podría ser posible determinar la respuesta individual a los tratamientos mediante un perfil genético.

### 3.3 Valoración de la respuesta al tratamiento

La respuesta del tumor primario a la neoadyuvancia parece ser un buen factor pronóstico, aunque esta relación es controvertida. En algunos estudios<sup>47, 48</sup> no se encuentra relación con la supervivencia, y en otros sí<sup>49, 50</sup>. Según el estudio del *German Rectal Cancer Study Group*<sup>49</sup> la regresión patológica completa (pCR) se asocia a un mejor control local, menor riesgo de desarrollo de metástasis a distancia y una mejora en la supervivencia libre de enfermedad. La respuesta varía con la dosis y fraccionamiento de la radiación, el tipo de QT, el intervalo hasta la cirugía, y el tamaño y estadio tumoral<sup>51, 52</sup>. Sin embargo existen evidencias que sugieren que el factor más importante es la biología tumoral<sup>24, 53</sup>.

Básicamente, para la valoración de la respuesta se han usado dos métodos: downstaging y el grado de regresión tumoral (GRT).

El “**downstaging**” se considera una forma más sencilla de comprobar la respuesta. Es la disminución del tamaño tumoral definida como la reducción de al menos un nivel T (de la clasificación TNM) medido inicialmente por ecografía endorrectal y/o RM pélvica y finalmente por el estudio patológico. Sin embargo su exactitud está limitada por la precisión de los estudios de imagen. En dos estudios de 1.184 y 357 pacientes la ecografía tuvo una precisión del 69-77%<sup>54, 55</sup>. La precisión de la ecografía para el estadiaje T está entre 73-94%<sup>56, 57</sup>, mientras que para el estadiaje N está más limitada, variando entre 58-83%<sup>58, 59</sup>. De forma similar, la precisión de la RM es del 58-88%<sup>60</sup>.

Los intentos de evaluación de la respuesta por endoscopia ó ecografía se complican por la dificultad de distinguir entre enfermedad residual, fibrosis e inflamación<sup>61, 62</sup>. La evaluación precisa de la respuesta al tratamiento sólo puede ser lograda con el estudio patológico detallado de la pieza quirúrgica. El sistema de categorización de los cambios histológicos en la pieza quirúrgica (grado de regresión tumoral, **GRT**) es un método para evaluar la respuesta al tratamiento neoadyuvante. Estos cambios incluyen alteraciones citológicas y cambios de fibrosis. Se han usado varias escalas semicuantitativas:

*Spitz et al*<sup>63</sup> han descrito un sistema basado en la cantidad de tumor residual: I, >90% de tumor residual; II, 10-90%; III, <10%; IV, sin tumor. En la experiencia de este grupo, 31% tienen respuesta completa.

En 1994 *Mandard et al*<sup>64</sup> publican un artículo de referencia sobre la respuesta a la RQT neoadyuvante en el cáncer de esófago; este grupo demuestra que el GRT es un factor predictor de supervivencia en estos pacientes. Se estudiaron una combinación de cambios celulares y del estroma para valorar la respuesta. Este sistema se ha adaptado para valorar la respuesta en el CR.

El sistema de *Dworak et al*<sup>65</sup> tiene en cuenta también cambios celulares y del estroma, es simple de aplicar y con poca variabilidad interobservador. Se clasifica en grados en función de la presencia de tumor residual y cambios estromales, variando desde 4 (sin tumor) hasta 0 (sin respuesta). El GRT descrito por *Dworak* está

relacionado con el pronóstico<sup>49</sup>. Sin embargo, los grados 2 y 3 no se correlacionan con el pronóstico, posiblemente porque la discriminación es bastante subjetiva.

Otros sistemas de gradación se han propuesto con 3 categorías, donde los respondedores intermedios se agrupan<sup>26, 66, 67</sup>. *Berger et al*<sup>68</sup>, describen un sistema de 3 grados basado en la densidad celular del tumor residual: grupo 1, sin tumor; grupo 2, con densidad media; grupo 3, con densidad alta. En este estudio no encuentran relación con la supervivencia. *Francois et al*<sup>69</sup> definen un sistema similar con resultados comparables al anterior.

### 3.4 Definición de biomarcadores

Un biomarcador puede ser definido como una sustancia objetivamente medible que puede ser usada como un indicador de un estado biológico ó patológico. Aplicado al proceso de una enfermedad, un biomarcador puede ser usado para detectar la enfermedad, predecir el pronóstico ó predecir la respuesta a determinados tratamientos. Un biomarcador debe dar información que ayude a facilitar y mejorar la esperanza de vida ó la calidad de vida para poder ser útil en la práctica clínica.

A lo largo de los últimos años se han descrito diversos mecanismos implicados en el desarrollo del CCR: mutaciones genéticas, inestabilidad cromosómica, inestabilidad de microsatélites y alteraciones epigenéticas, incluyendo la metilación. Con las investigaciones recientes de la matriz extracelular se ha añadido una nueva dimensión a nuestra comprensión de la carcinogénesis. Hoy en día, la visión del modelo de *Volgenstein* adenoma-carcinoma en la secuencia carcinogénica puede considerarse demasiado simplista.

Entre los problemas encontrados durante los ensayos de desarrollo y validación de biomarcadores están el número de biomarcadores que deben ser medidos, la variedad de las tecnologías disponibles y el coste y consumo de tiempo que implica cada una de ellas. Microarrays, nanotecnologías y secuenciación de ADN de alto volumen de última generación permiten una medición rápida y eficiente de múltiples marcadores. El desafío es desarrollar pruebas simples, sensibles, específicas, poco costosas y

reproducibles para que puedan tener una utilidad clínica significativa. El comité británico *Cancer Research UK Biomarker Discovery and Development Committee* ha definido 6 categorías de biomarcadores<sup>70</sup>:

1. Biomarcadores para valoración de riesgo/predisposición: son biomarcadores que pueden ser usados para definir a individuos ó grupos con riesgo aumentado de desarrollar una enfermedad. Por ejemplo, las mutaciones del gen APC en el diagnóstico de la poliposis adenomatosa familiar.
2. Biomarcadores de screening/detección precoz: son biomarcadores usados para ayudar al diagnóstico temprano de una enfermedad. Por ejemplo, los test de sangre oculta en heces para el CCR.
3. Biomarcadores diagnósticos: Son biomarcadores usados para definir el tipo de cáncer ó de enfermedad que padece el paciente. También pueden ser usados para detectar enfermedad recurrente. Por ejemplo, el antígeno prostático específico (PSA), ó el antígeno carcinoembriónico (CEA).
4. Biomarcadores farmacológicos: Son biomarcadores usados para medir los efectos de un tratamiento en una diana específica ó para demostrar efectos clínicos de un fármaco. Pueden ayudar en la optimización de las dosis y reducir los efectos secundarios. Por ejemplo, el gen de la tiopurinmetil transferasa (TPMT) y el tratamiento con azatioprina en la enfermedad de Crohn.
5. **Biomarcadores predictivos:** Son biomarcadores que pueden identificar un subgrupo de pacientes con mayor ó menor posibilidad de responder a una terapia específica. Por ejemplo, KRAS y la respuesta a terapias anti-EGFR.
6. Biomarcadores pronósticos: Son biomarcadores usados para predecir el curso de una enfermedad. Por ejemplo un marcador que refleje el potencial metastásico de un cáncer. Un gran número de ellos se han sugerido en el CCR, pero la mayoría no están validados.

### 3.5 Marcadores pronósticos en el cáncer de recto

Son los que predicen los resultados clínicos y están basados en estudios patológicos, de imagen y, en un futuro cercano, también en marcadores moleculares.

#### 3.5.1 Estudios de imagen

En RM, la distancia del tumor a la fascia mesorrectal ha demostrado ser un factor más importante de RL que el estadio TNM, porque el estadio T no discrimina entre CR que pueden ser fácilmente resecados con cirugía y tumores con alto riesgo de afectación del margen de resección circunferencial (CRM). En un metaanálisis, la sensibilidad varía entre 60-88% y la especificidad entre 73-100%. La ecografía endorrectal es especialmente útil en estadiar el CR temprano. La sensibilidad para discriminar entre un T1 y T2 está entre 69-97% pero hay más limitaciones entre T2-T3<sup>54</sup>. Una ventaja adicional de la ecografía es la posibilidad de realizar punciones ecoguiadas con aguja fina de lesiones ganglionares sospechosas. Para la predicción de la afectación ganglionar no hay grandes diferencias entre ecografía, RM ó tomografía computerizada (TC) con sensibilidades entre 55-67% y especificidades de 74-78%. Estudios más recientes sugieren que estos resultados pueden mejorar con el uso de criterios morfológicos adicionales en RM, como la extensión extracapsular ó la heterogeneidad en la señal, aumentando la sensibilidad hasta el 85% con especificidad del 97% para ganglios mayores de 3 mm<sup>71</sup>.

#### 3.5.2 Estudios histopatológicos

Los tumores T3-4, la afectación ganglionar (es decir, el estadio TN ó de Dukes), y la afectación del CRM se determinan de manera precisa. También son factores pronósticos de RL la afectación linfovascular, afectación venosa extramural y una pobre diferenciación. El estudio patológico también evalúa la respuesta a la RQT. Está demostrado mejor pronóstico con pCR. En un análisis combinado de 14 bases de datos con 3.105 pacientes con CR localmente avanzado tratados con RQT y posterior TME, 484 tenían pCR. La RL a los cinco años era del 2,8% en este grupo y del 9,7%

en el resto. La supervivencia a 5 años libre de metástasis a distancia era del 89 y 75% respectivamente<sup>72</sup>.

### 3.5.3 Marcadores moleculares

No hay ningún marcador molecular pronóstico específico a día de hoy para el CR. Una revisión reciente en CCR concluye que los marcadores de inestabilidad genómica, como la pérdida de heterocigocidad en el cromosoma 18q, inestabilidad de microsatélites ó la mutación B-Raf V600E son valiosos como marcadores pronósticos de resultados, aunque los resultados del CR no se presentan por separado<sup>73</sup>. Un estudio de perfiles de metilación del ADN en una serie de CR precoces identificó 5 marcadores que se expresan de forma distinta en T1-2N0 que en pacientes con enfermedad metastásica<sup>74</sup>. *He et al* estudiaron el significado de las mutaciones PIK3CA en una cohorte grande de CR. Los pacientes con mutaciones tienen mayor riesgo de RL<sup>75</sup>. Algunos estudios han sido capaces de identificar perfiles genéticos que se relacionan con el estadio N en CCR<sup>76-78</sup> aunque no hay un perfil específico del CR. Un estudio japonés ha demostrado las diferencias en expresión genética entre tumores de colon y recto-sigmoides<sup>79</sup>.

## 3.6 Marcadores predictivos en el cáncer de recto

Los marcadores predictivos pueden ser estudios histopatológicos, de imagen ó moleculares. Desde el punto de vista molecular, el CCR es una enfermedad heterogénea, lo que supone diferencias en la progresión, supervivencia y respuesta a tratamientos. Basados en los mecanismos conocidos de radioquimiosensibilidad, podemos entender las causas por las que la mayoría de los investigadores han centrado los estudios de biomarcadores de respuesta al tratamiento en moléculas que intervienen en la regulación del ciclo celular y la apoptosis, enzimas involucradas en el metabolismo de las fluoropirimidinas, oncogenes y genes supresores.

### 3.6.1 Estudios genómicos

---

Desde un punto de vista general, podemos distinguir entre análisis generales del genoma y análisis de uno ó varios biomarcadores.

#### 3.6.1.1 Análisis generales del genoma

---

##### 3.6.1.1.1 Perfiles de expresión genética

---

Varios investigadores han usado los perfiles de expresión para analizar la genética de la respuesta del CR a la RQT. La identificación de genes que se expresan de forma distinta entre tumores radiosensibles y radioresistentes por análisis genético global puede aportar datos para comprender los mecanismos de radioresistencia clínica y mejorar la eficacia de los tratamientos. Los estudios publicados asocian estas diferencias a genes relacionados con la reparación del ADN, apoptosis, factores de crecimiento, transducción, ciclo celular y adhesión. La radiación puede inhibir la proliferación celular ó inducir la muerte celular por apoptosis in vitro e inhibir el crecimiento tumoral in vivo. La asociación con radioresistencia se ha observado en genes como p53, ras, raf-1, bcl-2 y survivin<sup>80</sup>. La disponibilidad de la tecnología de expresión genética por microarrays permite el análisis simultáneo de miles de genes<sup>81</sup>. Se han publicado varios estudios en diversos tipos tumorales incluyendo tumores de cabeza y cuello, mama, esófago, páncreas, estómago, etc<sup>80</sup>.

Respecto a **estudios in vivo** en relación al CR, los resultados indican que se puede predecir la respuesta al tratamiento en algunos tumores y fármacos con el estudio de los perfiles genéticos. *Ghadimi et al*<sup>82</sup> comparan las diferencias genéticas entre tumores de 30 pacientes que fueron randomizados para recibir RT y QT como parte del *German Rectal Cancer Study Group*<sup>83</sup>. Encontraron diferencias significativas en 54 genes. Varios de estos genes están asociados a mecanismos de reparación del ADN (SMC1) y organización microtubular (cdc42BPA, Filamina A). Generan un algoritmo que permite predecir el comportamiento tumoral con una sensibilidad del 78% y especificidad del 86%. En un estudio posterior del mismo grupo con seguimiento, demuestran que estos genes pueden también ayudar a predecir RL y supervivencia libre de enfermedad<sup>84</sup>. *Watanabe et al*<sup>85</sup> identificaron 33 genes en 52 pacientes usando el chip genético U95Av2. Entre ellos hay reguladores de apoptosis.

*Kim et al*<sup>86</sup> usaron 95 genes para predecir la respuesta con una precisión del 88,6%. La lista incluye genes relacionados con factores de crecimiento, apoptosis, proliferación, transducción y adhesión celular (TDGF3, RAC2, TYRO3, PSPHL, etc.). *Rimkus et al*<sup>87</sup> analizaron un grupo de 42 genes que se expresan de forma distinta entre respondedores y no respondedores. En un estudio más reciente, *Brettingham-Moore et al*<sup>88</sup> clasificaron en 51 pacientes los genes basados en la respuesta por el GRT, respuesta metabólica y disminución del estadio, prediciendo la respuesta con una sensibilidad del 82% y especificidad del 89%. Todos esos estudios nos indican que la mayoría de los genes se asocian a apoptosis, reparación del ADN, factores de crecimiento, ciclo celular, adhesión, invasión, metástasis, angiogénesis e hipoxia. Es destacable que muchos de estos genes predictores son distintos en cada estudio con pocas coincidencias. Estas diferencias pueden ser debidas a distintos regímenes terapéuticos, tipos tumorales y/o métodos de análisis.

Los **estudios in vitro** se usan con frecuencia como modelos para descubrimiento de fármacos, análisis funcionales y otros propósitos. *Eschrich et al*<sup>89</sup> fueron los primeros en publicar un modelo basado en expresión génica in vitro. Construyeron un algoritmo para predecir radiosensibilidad con valor predictivo positivo del 86%. De forma similar, *Spitzner et al*<sup>90</sup> identificaron un perfil genético para la sensibilidad de líneas celulares de CCR a la RQT.

#### 3.6.1.1.2 Aberraciones cromosómicas

La aneuploidia cromosómica es un hallazgo característico del CCR. Uno de los primeros estudios en analizar las diferencias del ADN es el publicado por *Grade et al*<sup>91</sup> con 42 pacientes. Identificaron alteraciones en los cromosomas 7 y 20 que se asocian a buena respuesta a la RQT. En un estudio más reciente, *Chen et al*<sup>52</sup> analizaron las alteraciones cromosómicas en el número de copias (CNAs) en 95 casos. Los resultados indican que los CNAs detectados pueden ayudar a identificar pacientes con pCR. En concreto se localizan regiones en los cromosomas 12 y 15 y construyen un modelo predictivo con alto grado de precisión. Está bien documentado que la localización influye en el perfil de mutaciones del tumor. En general los tumores de colon tienen mayor nivel de inestabilidad de microsatélites comparado con los tumores del recto. En contraste los tumores de recto tienen mayor proporción de mutaciones del

gen TP53<sup>92</sup>. El CR localmente avanzado tiene unos patrones específicos de CNAs que pueden ser identificados. Algunos de ellos son más comunes en tumores que responden a la RQT. Estos CNAs contienen genes que forman parte de mecanismos de acción relacionados con la respuesta tumoral al tratamiento neoadyuvante.

Recientemente, *Molinari et al*<sup>93</sup> estudiaron 51 casos donde identifican alteraciones en regiones cromosómicas específicas capaces de distinguir entre tumores respondedores y no respondedores, localizadas principalmente en los cromosomas 7, 13 y 17.

### 3.6.1.2 Análisis de biomarcadores

---

#### 3.6.1.2.1 Mutaciones del ADN en la vía RAS-MAPK

---

Debido a la evidencia preliminar que indica que el oncogén RAS aumenta la radioresistencia in vitro<sup>45</sup>, varios estudios han investigado la potencial relevancia de la vía RAS-MAPK en la respuesta a la RQT en el CR. El KRAS es un componente clave de la vía mitógena que se activa por receptores de la superficie celular como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Mutaciones del gen resultan en una activación persistente de este mecanismo y están presentes en un tercio de los CCR. El descubrimiento de que la mutación del KRAS es un predictor de respuesta al tratamiento con los anticuerpos monoclonales anti-EGFR cetuximab y panitumumab ha establecido a dicho gen como un importante biomarcador en el CCR<sup>94</sup>. De hecho la mutación del KRAS se estudia de rutina en la selección de pacientes para la terapia anti-EGFR<sup>95</sup>. Pocos estudios han evaluado al KRAS como biomarcador de la respuesta en el CR. Para *Luna Pérez et al*<sup>96</sup> los tumores sin mutación del KRAS (*wild type*) tienen mejor respuesta a RQT. En la misma línea están los estudios de *Bengala et al*<sup>97</sup>. Por tanto un KRAS mutado sería un marcador de resistencia a respuesta, aunque hay estudios con resultados contradictorios. *Erben et al*<sup>98</sup> y *Gaedcke et al*<sup>99</sup> no encontraron relación aunque son series pequeñas y usan distintos fármacos. Recientemente, *García Aguilar et al*<sup>100</sup> estudiaron 132 pacientes con CR tratados con RQT neoadyuvante e identificaron un subgrupo de pacientes (n=27) con mutaciones combinadas del p53 y v-Ki-ras 2 sin pCR en ninguno de ellos. Estos estudios con

resultados en ocasiones conflictivos indican que la determinación del status del KRAS no sería suficiente.

#### 3.6.1.2.2 Polimorfismos de nucleótido único

Estos polimorfismos (*single-nucleotide polymorphisms*, SNPs) son lugares en la secuencia genómica que diferencian individuos por una única base. Los SNPs se estiman en el genoma humano en torno a 10 millones y se distribuyen con una frecuencia entre 1 cada 300-1.000 pares de bases<sup>45</sup>. Algunos de ellos se han asociado a aumento de riesgo de desarrollar CCR. Se ha especulado con la posibilidad de que puedan alterar la respuesta a la RQT en el CR.

En esta línea se ha estudiado la timidilatosintetasa (**TS**) pero los resultados son conflictivos. Se han realizado estudios de polimorfismos en la región promotora del gen TS, responsable de la iniciación de la transcripción genética y puede por tanto implicar ciertas diferencias en la actividad de acuerdo con el genotipo. *Villafranca et al*<sup>101</sup> fueron los primeros en estudiar el valor predictivo del polimorfismo de la TS en el CR tratado con neoadyuvancia. Los pacientes con TS 3R/3R tienen una menor probabilidad de respuesta (downstaging). En la misma línea están los estudios de *Stoehlmacher et al*<sup>102</sup>, *Balboa et al*<sup>103</sup>, *Páez et al*<sup>104</sup> y *Cecchin et al*<sup>105</sup>. En el estudio de *Spindler et al*<sup>106</sup> los pacientes con genotipo TS 2/2 tuvieron mayor tasa de respuesta, aunque no se considera suficientemente fuerte como predictor de pCR. Una mayor respuesta a 5-FU se ha visto en pacientes con genotipo TS 3/3 combinado con genotipos específicos del gen **MTHFR**. El grupo de *García Aguilar*<sup>100</sup> también estudió el gen MTHFR. Su actividad reducida en pacientes portadores de polimorfismos de este gen aumenta el efecto de inhibidores de la TS como el 5-FU. Datos del estudio de *Hur et al*<sup>107</sup> van en la misma línea. Sin embargo, en los estudios de *Terrazino et al*<sup>108</sup> y *Conradi et al*<sup>109</sup> no encontraron asociación entre el genotipo TS y parámetros clínicos relevantes.

Otro ejemplo de este tipo de estudios es el trabajo de *Schirmer et al*<sup>110</sup>. Analizaron polimorfismos en la línea germinal del gen **TGFB1** que se asocian a toxicidad aguda en pacientes con CR. Los pacientes con la variante Pro25 del gen

desarrollan toxicidad aguda con la RQT basada en 5-FU en CR con un valor predictivo positivo del 100%.

Estudios in vitro demuestran que células con polimorfismos del gen **XRCC1** son más sensibles a la radiación ionizante. Aunque existen algunos estudios clínicos donde el polimorfismo mononucleótido del gen XRCC1 es predictivo de resistencia<sup>111, 112</sup>, estos datos no se confirmaron en otros<sup>103-105, 113</sup>.

Se han identificado polimorfismos en el gen **EGFR**, localizados en la región promotora Sp1-216, encontrando diferencias en la respuesta en unos y otros<sup>114</sup>. También se han descrito polimorfismos en el ligando del receptor, EGF, que podrían influenciar los resultados de las terapias anti-EGFR<sup>115</sup>. *Spindler et al*<sup>106</sup> encontraron que combinando en el análisis genético los polimorfismos de TS y EGF A61G, se identifica un pequeño subgrupo donde la respuesta completa es del 100%.

#### 3.6.1.2.3 Otros estudios

---

El gen **DCC** (*Deleted in Colorectal Cancer*) es un gen supresor tumoral del cromosoma 18q. *Shibata et al* encontraron que la ausencia expresión se asocia a peor pronóstico en CCR<sup>116</sup>. Sin embargo, *Saw et al*<sup>117</sup>, no encontraron relación entre su expresión y la respuesta al tratamiento en una serie de 60 pacientes.

Las proteínas reparadoras del ADN (*mismatch repair proteins*, MMR) también han sido investigadas. La **inestabilidad de microsatélites** es un defecto que se asocia a alteraciones en los genes reparadores del ADN y se encuentra en el 95% de CCR hereditarios y el 15% de los esporádicos. Es conocido que los tumores con inestabilidad de los microsatélites parecen tener mejor pronóstico. Sin embargo, en los estudios publicados<sup>118, 119</sup>, no parece que la presencia de esta característica sea predictora de mejor respuesta a la RQT.

Los **microRNAs** (miRNAs) son secuencias pequeñas de 18-25 nucleótidos que son reguladores postranscripcionales de la expresión genética. Varios estudios han demostrado que la sobre ó subexpresión de miRNAs específicos se asocia al desarrollo y diferenciación del CCR; algunos de ellos se relacionan con la supervivencia<sup>120</sup>. Estudios in vitro sugieren que algunos miRNAs pueden afectar la

sensibilidad de distintas líneas celulares de tumores humanos a agentes quimioterápicos<sup>121</sup>. El estudio de *Scarpati et al*<sup>122</sup> es el primero en identificar un cluster de 13 miRNAs que se expresan en el CR primario y se relacionan significativamente con muy buena respuesta (pCR) después de RQT con capecitabina y oxaliplatino (n=38). Once de ellos se sobreexpresan y dos se subexpresan. Identifican dos de ellos (miR-630 y miR-622) con una sensibilidad y especificidad del 100%. En el mismo contexto, *Svodoba et al*<sup>123</sup> estudian 9 miRNAs en 35 pacientes encontrando una gran variabilidad sin resultados concluyentes.

Muchos de estos estudios, previamente descritos, están limitados por el uso de biopsias de tejido en fresco ó congeladas que incluyen, además de células tumorales, elementos no neoplásicos como el estroma, vasos, células inflamatorias y focos de necrosis, que pueden introducir errores en los resultados finales y pueden ser la explicación de la falta de acuerdo entre varios de ellos.

### 3.6.2 Estudios proteómicos

Como método no invasivo de monitorización de la respuesta, es de importancia el desarrollo de las técnicas de estudios proteómicos séricos. Parte de la premisa de que cada célula produce proteínas que se vierten al flujo sanguíneo<sup>124</sup>. De la misma manera, las células tumorales verterán sus propias proteínas características que pueden ser detectadas en análisis proteómicos usando cantidades muy pequeñas de suero. Los resultados son analizados usando algoritmos. *Allal et al*<sup>125</sup> estudiaron 56 proteínas de 17 pacientes con y sin radioresistencia. Algunas de interés son la tropomodulina,  $\beta$ -tubulina, anexina, calsenilina, queratina tipo 1, la proteína reparadora del ADN RAD51L3 y otras. *Smith et al*<sup>126</sup> identificaron una cohorte de 14 proteínas para diferenciar respondedores de no respondedores con una sensibilidad del 87,5% y especificidad del 80% usando análisis proteómico de bajo peso molecular.

### 3.6.3 Estudios de inmunohistoquímica (tissue microarrays)

La disponibilidad de una tecnología más sencilla, económica y de alto rendimiento como la inmunohistoquímica (IHQ) de tissue microarrays nos da la oportunidad de desarrollar un gran panel de biomarcadores para estudios. En la última década, un gran número de estudios nos han mostrado diferencias en la expresión de multitud de genes. Más de cuarenta biomarcadores han sido estudiados pero los resultados son conflictivos.

#### 3.6.3.1 Reguladores del ciclo celular

Uno de los marcadores más estudiado es el **p53**. Juega un papel importante en la estabilidad genética, proliferación celular, apoptosis e inhibición de la angiogénesis<sup>127</sup>. Es un gen supresor tumoral, que controla el ciclo celular desde la fase G1 hasta la fase S e induce muerte celular en la fase G1. Activa la apoptosis de células alteradas como resultado de cambios del ADN (por ejemplo, por la RT). El gen p53 está frecuentemente mutado ó inactivado en un 60% de tumores. En el CR su tasa de mutación es del 40-60%<sup>128</sup>. Varios estudios muestran un impacto negativo en el pronóstico cuando está presente la mutación de p53<sup>128, 129</sup>, aunque no siempre se ha confirmado<sup>130</sup>. Su expresión se determina por IHQ ó por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). La tinción positiva indica la presencia de p53 mutado (no funcionando), mientras que su negatividad refleja un p53 normal. *Bertolini et al*<sup>131</sup> (n=91) y *Chang et al*<sup>132</sup> (n=130) no encontraron relación entre la expresión de p53 y la respuesta al tratamiento en dos series de CR. En la misma línea están los estudios de *Saw et al*<sup>117</sup> (n=60) y otros<sup>133</sup>. Sin embargo, *Huerta et al*<sup>134</sup> (n=38), *Luna Pérez et al*<sup>135</sup> (n=26), *Spitz et al*<sup>63</sup> (n=42) y *Esposito et al*<sup>136</sup> (n=38) encontraron relación entre la sobreexpresión de p53 y una pobre respuesta. *Lin et al*<sup>137</sup> (n=53) mostraron que la negatividad del p53 predice una buena respuesta a la RQT.

Los genes p21, p27 y p57 son inhibidores del ciclo celular. Bloquean la progresión del ciclo e impiden la proliferación celular actuando a nivel de la generación de ARNm. La proteína p53 induce la expresión del **p21**. El p21 es un gen supresor tumoral, que cuando se activa en respuesta al daño en el ADN causa detención del ciclo celular en G1 por bloqueo de las quinasas ciclin-dependientes (CDK)<sup>138</sup>. Estudios

in vitro sugieren que las mutaciones del p21 son útiles para sensibilizar a las células del CCR humano a la RQT<sup>139, 140</sup>. *Seicean et al*<sup>129</sup> encontraron asociación entre p21 y buen pronóstico en el CR. *Charara et al*<sup>118</sup> (n=57) y *Rau et al*<sup>119</sup> (n=66) encontraron que la expresión del p21 se asocia a buena respuesta, mientras que *Reerink et al*<sup>25</sup> (n=34) muestran lo contrario, y *Bertolini et al*<sup>131</sup> (n=91) no encontraron relación con la respuesta pero si con la supervivencia libre de enfermedad. Más recientemente, *Molinari et al*<sup>93</sup> (n=51), tampoco encontraron relación entre la expresión del p21 y la respuesta. *Fu et al*<sup>141</sup> demostraron un valor combinado predictivo del p53 y p21 con la regresión tumoral; más del 80% de tumores p53 negativos/p21 positivos fueron radiosensibles y más del 90% p53 positivos/p21 negativos fueron radioresistentes. Sin embargo estos resultados no se han podido reproducir por otros grupos<sup>142</sup>. De forma similar, el **p27** es otro inhibidor CDK que actúa fundamentalmente inhibiendo los complejos de ciclin D-CDK-4 y E-CDK-2<sup>143</sup>. El posible papel de esta molécula fue estudiado inicialmente por *Esposito et al*<sup>136</sup>, que encontraron una asociación entre la sobreexpresión y una mala respuesta tumoral. Sin embargo estudios posteriores no confirmaron esta asociación<sup>142, 143</sup>. *Lin et al*<sup>137</sup> (n=70) refiere que los tumores p27 positivos y p53 negativos se asocian a buena respuesta a RQT aunque no se relaciona con el downstaging.

### 3.6.3.2 Marcadores de proliferación e índice mitótico

El **ki-67** es un marcador de proliferación celular y se puede detectar en todas las fases activas del ciclo celular<sup>144</sup>. Es un buen marcador de proliferación con valor pronóstico y/o predictivo en distintos tipos de tumores. Sin embargo, no se han establecido asociaciones clínicas entre ki-67 y la sensibilidad a RT ó QT, y como factor pronóstico en CCR los resultados no son concluyentes<sup>145</sup>. Respecto a su valor predictivo, existen varios estudios con resultados contradictorios. *Kim et al*<sup>146</sup> (n=23) encontraron que los buenos respondedores tienen un índice ki-67 elevado (número de células con tinción positiva para ki-67 por cada 1.000), mientras que *Jakob et al*<sup>147</sup> (n=22) mostraron lo contrario. Otros estudios no encuentran relación<sup>93</sup>. *Willett et al*<sup>148</sup> (n=90) encontraron unos niveles de antígeno nuclear de las células proliferativas elevado asociado a una mayor posibilidad de respuesta a RQT. Otros estudios no encontraron esa correlación<sup>149, 150</sup>.

**EZH2** es un gen regulador que puede ser afectado por la activación de p53. EZH2 es un regulador del ciclo celular. Su sobreexpresión está descrita en varios carcinomas y se ha asociado con proliferación de las células tumorales y mal pronóstico en cánceres de mama, endometrio, próstata y melanomas. *Fluge et al*<sup>151</sup> encontraron que la expresión de la proteína EZH2 se relaciona con el ki-67. El nivel alto se relaciona con un mejor intervalo libre de enfermedad con cáncer de colon pero no en recto, igual que la positividad del ki-67. Por tanto estos índices de proliferación no son marcadores adversos en cáncer de colon estadios II y III que reciben QT.

### 3.6.3.3 Marcadores de apoptosis

La apoptosis es un mecanismo importante de acción del tratamiento. Se considera que los tumores con mecanismos de apoptosis intactos son más sensibles a la RQT. La apoptosis se define por distintos cambios morfológicos y bioquímicos mediados por una familia de cisteín-proteasas ó caspasas que se activan por distintos estímulos. Se han definido dos vías distintas de activación, extrínseca e intrínseca. La extrínseca se inicia por receptores transmembrana (CD95, TNF, TRAIL) que activan la cascada de las caspasas, mientras que la intrínseca requiere la liberación de proteínas y del citocromo C después de la rotura de la membrana mitocondrial. Alteraciones de la apoptosis inducen radioresistencia en los tumores de recto<sup>152</sup>. Se ha demostrado por algunos autores el valor del índice espontáneo de apoptosis en relación con la regresión tumoral. En uno de los estudios con mayor número de pacientes, *Rodel et al*<sup>153</sup> encontraron no sólo esta relación sino también una mejora en la supervivencia libre de enfermedad. Uno de los métodos de valoración de la apoptosis es el anticuerpo c-CK18, introducido por *Leers et al*<sup>154</sup>. El uso de este anticuerpo permite la detección de apoptosis en fases tempranas. La liberación del citocromo C de la mitocondria, paso clave en la vía de la apoptosis celular, se regula por un equilibrio entre los miembros proapoptóticos (bax, bak y bad, Bcl-Xs) y antiapoptóticos (Bcl-2 y Bcl-XL, Mcl-1) de la familia Bcl-2. En el inicio de la vía intrínseca, el p53 también juega un papel importante<sup>155</sup>. Las proteínas BAX y Bcl-2 se han estudiado de forma extensa, pertenecen al grupo de oncogenes relacionados con la apoptosis<sup>156</sup>.

**BAX** es la contraparte apoptótica de Bcl-2, que inhibe la apoptosis celular. Su expresión induce permeabilidad mitocondrial, que lleva a la liberación de citocromo C y

la iniciación de daño del ADN y muerte celular<sup>157</sup>. La mutación de BAX se relaciona con resistencia a agentes quimioterápicos en el CCR<sup>156</sup>, mientras que su sobreexpresión aumenta la sensibilidad a fármacos por aumento de la inducción a la apoptosis<sup>158, 159</sup>. Estos estudios están en la línea del de *Chang et al*<sup>132</sup> (n=130), que encontraron que tumores con pCR tienen niveles de BAX más elevados que los respondedores parciales. Sin embargo *Rau et al*<sup>119</sup> no encontraron esta relación.

El oncogén **BCL-2** (*B-cell lymphoma 2*) es un proto-oncogén con un papel anti-apoptótico que prolonga la vida celular. Suprime la apoptosis controlando la permeabilidad de la membrana mitocondrial. La ausencia de Bcl-2 se asocia a invasión local y RL en el CR<sup>160</sup>, pero su influencia en la supervivencia no está demostrada<sup>24, 129, 161</sup>. La sobreexpresión de Bcl-2 se relaciona por otro lado con resistencia a muchos agentes quimioterápicos y parece proteger a las células de la apoptosis inducida por la radiación<sup>162, 163</sup>. Aunque varios estudios clínicos encuentran un impacto negativo en la sobreexpresión de Bcl-2, particularmente en enfermedades malignas hematológicas<sup>164</sup>, otros encuentran su expresión relacionada con buenos resultados, especialmente en tumores sólidos, incluido en CR<sup>165, 166</sup>. *Allal et al*<sup>155</sup> encuentran que la expresión de Bcl-2 se asocia a mejor respuesta en pacientes tratados con RT en cáncer anal. *Rich et al*<sup>167</sup> demostraron una relación inversa entre la expresión de Bcl-2 y la respuesta a la neoadyuvancia en CR. Sin embargo, otros estudios no han confirmado estos hallazgos<sup>53, 142</sup>. Es posible que la relación Bcl-2/BAX tenga mayor valor que el nivel de detección por IHQ<sup>130</sup>. *Shinoura et al*<sup>168</sup> demostraron que la función antiapoptótica de Bcl-2 es dependiente de su nivel, porque con baja expresión inhibe la función proapoptótica, mientras que su sobreexpresión induce de forma rápida la apoptosis en células de glioblastoma. También se ha demostrado que la sobreexpresión de Bcl-2 aumenta la vida media de la proteína proapoptótica BAX<sup>169</sup>.

En la misma línea están los estudios del **APAF-1** (*Apoptosis Protease-Activating Factor 1*), un regulador crítico de la vía mitocondrial de la apoptosis. Se une al citocromo C y a caspasa 9 para formar un complejo (*apoptosome*) que activa la apoptosis<sup>170</sup>. *Zlobec et al*<sup>171</sup> encontraron asociación entre la ausencia del APAF-1 y peores resultados clínicos. *Paik et al*<sup>172</sup> demostraron en una larga serie de 529 CCR que la pérdida del APAF-1 se asocia con más frecuencia a casos con estadio pTN avanzado. También se asocia a células metastásicas, sugiriendo su relación con la progresión tumoral<sup>173</sup>. El papel del APAF-1 en la resistencia a la neoadyuvancia no ha

sido muy investigado. En el estudio de *Zlobec et al*<sup>174</sup> con 94 casos de CR tratados con braquiterapia neoadyuvante se demostró una relación entre la sobreexpresión del APAF-1 y buena respuesta. En la misma línea está el estudio de *Edden et al*<sup>142</sup>.

**Survivin** es otra molécula antiapoptótica, miembro de la familia de inhibidores de la apoptosis (IAP, XIAP). *Sarela et al*<sup>175</sup> (n=49) mostraron relación entre la expresión de survivin y peor supervivencia. Estudios in vitro han demostrado que agentes terapéuticos que actúan sobre los niveles de XIAP mejoran la respuesta a la RQT<sup>176</sup>. El gen survivin se ha estudiado como inhibidor de la apoptosis y predictor de peor supervivencia en CCR<sup>177, 178</sup>. Se ha demostrado relación inversa entre la expresión de survivin y la apoptosis espontánea ó la inducida por la radiación<sup>179</sup> y aumento de riesgo de RL en tumores rectales con sobreexpresión<sup>180</sup>. La potencial importancia de survivin para la monitorización de la respuesta se ha confirmado recientemente por *Sprenger et al*<sup>181</sup>, que demostraron que la sobreexpresión de survivin se correlaciona con peor respuesta y peor supervivencia libre de enfermedad. Los inhibidores de survivin se están investigando actualmente en ensayos clínicos y se verá si en el futuro representan una estrategia efectiva y útil para la radioquimiosensibilización<sup>182</sup>.

#### 3.6.3.4 Angiogénesis e hipoxia

La angiogénesis es fundamental para el crecimiento y supervivencia tumoral. Por ello, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) ha sido investigado. El **VEGF** es un potente promotor angiogénico. La activación del receptor tiene efectos en la proliferación de la célula endotelial, migración, supervivencia y permeabilidad vascular<sup>183</sup>. La angiogénesis tumoral disminuye la eficacia de la RT. Con frecuencia los vasos tumorales tienen una arquitectura desorganizada que contribuye a crear regiones tumorales con hipoxia. El VEGFR-2 se considera un mediador principal de la angiogénesis en tumores humanos, mientras que el VEGFR-1 tiene un papel primario durante la angiogénesis y regula la apoptosis y el crecimiento tumoral<sup>184</sup>. La inhibición del VEGFR ó de su ligando VEGF es efectiva en distintos tipos tumorales. Fármacos que bloquean el VEGF ó las señales de su receptor (bevacizumab) han demostrado resultados prometedores<sup>183, 185, 186</sup>. En el CCR, la sobreexpresión del VEGF se asocia a agresividad tumoral, peor supervivencia, recidiva local y enfermedad a distancia. Sin

embargo, los datos sobre la expresión del VEGF y su receptor VEGFR es controvertida. *Zlobec et al*<sup>187</sup> demostraron en una cohorte de 104 pacientes que los casos VEGF positivos y EGFR negativos se asocian a una ausencia de pCR. En un estudio previo, el mismo grupo (n=59) ya había publicado que bajos niveles del VEGF se relacionan con la respuesta a la RT en el CR<sup>188</sup>. Sin embargo, más recientemente, *Schwaab et al*<sup>189</sup> no encontraron relación entre la expresión del VEGFR-1/2 y la respuesta a RQT en un grupo de 33 pacientes. *Willett et al*<sup>190</sup> han mostrado que 12 días después de la administración de la primera dosis de bevacizumab se aumenta de manera significativa la apoptosis celular tumoral; sin embargo hay una tendencia a un aumento de la proliferación, posiblemente por una mejoría del entorno celular por una normalización vascular.

También se considera que el oxígeno es vital en la respuesta celular al daño del ADN inducido por la RT. Los tumores con poca oxigenación, en general, son más radioresistentes. *Dietz et al*<sup>191</sup> han encontrado que los tumores rectales que no responden a RQT tienen mayores niveles de hipoxia. Se considera que la hipoxia previene la degradación del factor 1- $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), regulador de procesos como la angiogénesis y el crecimiento celular<sup>192</sup>. El factor-1 inducible por hipoxia (**HIF-1**) es un factor de transcripción que se estabiliza con tensiones bajas de oxígeno y regula más de 100 moléculas que ayudan a proteger las células del stress producido por la hipoxia. El HIF-1 afecta a muchos procesos (glucólisis, mitosis, apoptosis y angiogénesis) que pueden influir en la radiosensibilidad tumoral. El HIF-1 puede estimular a las células tumorales a expresar citoquinas de efectos radioprotectores. Algunas de ellas, incluyendo el VEGF y otros factores, envían señales antiapoptóticas a los vasos tumorales. *Toiyama et al*<sup>193</sup> mostraron que los tumores de recto con sobreexpresión de HIF-1 son peores respondedores a la RQT (n=40), al igual que *Korkeila et al*<sup>194</sup> (n=39). Sin embargo *Havelund et al*<sup>195</sup> no encuentran ninguna asociación (n=86). Bajo condiciones de hipoxia, las células tumorales modifican su metabolismo de la glucosa aeróbico a una glucólisis anaerobia; la transcripción de varios genes en este proceso está mediada por el HIF-1, uno de ellos es el transportador de glucosa-1 (**GLUT-1**), que facilita el transporte de glucosa a través de la membrana y se sobreexpresa como el HIF-1 en numerosos tumores malignos incluyendo el CCR, y ambos se asocian a comportamientos tumorales más agresivos y peor pronóstico en el CR<sup>196, 197</sup>. *Brophy et al*<sup>198</sup> encontraron correlación entre la

sobreexpresión de GLUT-1 y mala respuesta (n=69), aunque otros autores no encontraron esa asociación<sup>195</sup>. La anhidrasa carbónica IX (**CA IX**), que puede ser activada por HIF-1 $\alpha$ , se sobreexpresa en varios tipos tumorales y ha sido también ampliamente investigada. En muchos tumores colorrectales tiene un patrón de expresión alterado, lo que puede tener influencia en su patogénesis<sup>199, 200</sup>.

#### 3.6.3.5 Otros marcadores

Varios estudios han mostrado que los pacientes que toman AINEs de forma regular tienen menor incidencia de pólipos colorrectales, cáncer y mortalidad asociada a estos tumores. Los AINEs inhiben la ciclooxigenasa (COX). Es conocido que la COX tiene básicamente 2 isoformas, COX-1 y 2. La ciclooxigenasa 2 (**COX-2**) es una enzima que cataliza la conversión de ácido araquidónico a prostaglandinas y tiene un papel importante en la progresión del CCR<sup>201</sup>. Las células tumorales pueden usar estos productos como factores protectores y son mediadores de la invasividad y potencial metastásico. La inhibición selectiva de la COX-2 limita el crecimiento de metástasis en modelos animales<sup>202</sup>. Varios estudios han demostrado que la sobreexpresión de la COX-2 se asocia a peor respuesta tumoral a la neoadyuvancia. *Smith et al*<sup>203</sup> y *Kobayashi et al*<sup>204</sup> encontraron que los pacientes con sobreexpresión de la COX-2 tienen peor respuesta a RQT. En la misma línea están los estudios de *Min et al*<sup>205</sup>, *Giralt et al*<sup>186</sup> y *Edden et al*<sup>142</sup>. Sugieren que la inhibición de la COX-2 previa al tratamiento pudiera mejorar las tasas de respuesta, como apuntan algunos estudios<sup>206, 207</sup>, aunque se necesitarían más datos que avalen la eficacia de los inhibidores de la COX-2 como radiosensibilizadores en el CR. La sobreexpresión dual de la COX-2 y el VEGF puede estar relacionada ya que se ha demostrado que la COX-2 estimula de forma directa la síntesis del VEGF y por tanto la angiogénesis<sup>142</sup>.

La activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina por la mutación e inactivación del gen supresor de la poliposis adenomatosa del colon es un paso temprano en la carcinogénesis colorrectal<sup>208-210</sup>. La sobreexpresión de la  **$\beta$ -catenina** activa esta vía e incrementa la proliferación celular<sup>211, 212</sup>. La  $\beta$ -catenina se considera un oncogén potencial en el CCR esporádico<sup>213</sup> y su distribución a nivel celular parece de importancia en el comportamiento tumoral. Los datos que relacionan su expresión son contradictorios<sup>214-216</sup>. *Drebber et al*<sup>47</sup> encuentran que los niveles bajos preoperatorios

se asocian significativamente a una mayor respuesta. Algunos estudios han demostrado que la tinción para la  $\beta$ -catenina está aumentada a nivel de membrana ó citoplasma celular en 65-85% de CCR y a nivel nuclear en 18-26%<sup>47, 214</sup>. Poco se conoce de la regulación de la expresión de la  $\beta$ -catenina con el tratamiento neoadyuvante.

El protooncogén **HER2** (ERBB2 ó NEU) codifica un receptor tirosin-quinasa transmembrana que se expresa en las células epiteliales. Su sobreexpresión se ha descrito en diferentes tumores, mama, pulmón y CCR, y se asocia a proliferación celular. Su significación en el CCR respecto a progresión y pronóstico no es clara<sup>217, 218</sup>. El HER2 es una diana terapéutica en diversos tumores malignos. La sobreexpresión del HER2 en el cáncer de mama se asocia a peor pronóstico y también en otros tumores<sup>219, 220</sup>. El porcentaje de expresión en el CCR está entre 27-38% y no se asocia con otros parámetros clínicos ni histológicos; sin embargo se ha encontrado asociación con su sobreexpresión y una mejor supervivencia<sup>47, 221, 222</sup>.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico, **EGFR** (HER1), está involucrado en la proliferación, apoptosis y diferenciación celular. Se expresa en el 60-80% de los tumores colorrectales. El EGFR puede ser activado por la radiación ionizante, así como por sus ligandos naturales e inducir secreción autocrina de TGF- $\alpha$ . Los tumores que sobreexpresan el EGFR tienen menos posibilidades (x13 OR) de tener pCR después de la RQT<sup>113</sup>. Como es conocido que los anticuerpos antiEGFR han mostrado eficacia en el CCR metastásico, también se ha estudiado la relación entre su expresión y la respuesta. Aunque su valor pronóstico ha sido investigado con frecuencia, sólo hay unos pocos estudios sobre su valor predictivo en respuesta a la RQT. Los estudios in vitro han asociado su sobreexpresión con mala respuesta. Los estudios de *Giralt et al*<sup>223</sup> (n=87), *Kim et al*<sup>224</sup>, *Spindler et al*<sup>114</sup> (n=60), y *Zlobec et al*<sup>87</sup> (n=104) están en esa línea. Parece de mayor valor la medición cuantitativa de la expresión del EGFR que la positividad ó negatividad en la tinción. A pesar de ello, el cetuximab no se considera una terapia recomendada inicialmente en el tratamiento neoadyuvante<sup>225</sup>, aunque *Jonker et al*<sup>226</sup> han demostrado mejoras en la supervivencia en pacientes con CCR que expresan el EGFR y no responden a otros tratamientos quimioterápicos. *Bertolini et al*<sup>131</sup> no han encontrado en cambio esa relación (n=125).

La timidilatosintetasa (**TS**) también ha sido extensamente estudiada. La TS es crítica en las síntesis del ADN y es diana del tratamiento con fluoropirimidinas que se usan de forma habitual en combinación con la radioterapia neoadyuvante. Los resultados son contradictorios. En general, su sobreexpresión se asocia a resistencia al 5-FU y peor pronóstico<sup>227</sup>. *Jakob et al*<sup>228</sup> (n=40) encontraron una asociación significativa entre baja expresión de la TS y la timidinfosforilasa y una buena respuesta a la neoadyuvancia. También *Okonkwo et al*<sup>229</sup> (n=25) y *Saw et al*<sup>117</sup> (n=60) encontraron que la falta de expresión de la TS se asocia a buena respuesta, mientras que *Negri et al*<sup>230</sup> (n=57), y *Carlomagno et al*<sup>113</sup> (n=46) muestran lo contrario. Los estudios de *Bertolini et al*<sup>131</sup> (n=125) no encontraron relación.

Muchos tumores muestran un metabolismo glucolítico aumentado incluso en presencia de oxígeno (glucolisis aeróbica). La detección de la transketolasa **TKTL1** describió por vez primera un enlace entre la glucolisis y el cáncer<sup>231</sup>. Recientemente se ha descrito relación entre la expresión aumentada de la TKTL1 y mal pronóstico en el CR, pero sin relación con la respuesta al tratamiento<sup>189</sup>.

En los últimos años se han evaluado diversos regímenes de quimioterapia neoadyuvante más intensos para mejorar las tasas de respuesta. Del tratamiento habitual basado en 5-FU se ha ampliado el armamentarium con irinotecan, oxaliplatino, cetuximab y bevacizumab. Algunos estudios recientes se han centrado en identificar perfiles y biomarcadores predictores de respuesta a estos fármacos<sup>117, 232</sup>. *Horisberger et al*<sup>232</sup> estudiaron la expresión de la topoisomerasa I (**Topo-I**) y la TS (n=38) y su relación con la respuesta a la neoadyuvancia basada en irinotecan, encontrando relación entre la expresión de la Topo-I y la respuesta (downstaging); con la expresión de la TS no encontraron asociación.

#### 3.6.3.6 Matriz extracelular

Entre los mecanismos de adquisición de motilidad e invasividad tumoral se considera actualmente de importancia el microambiente tumoral y la presencia de fibroblastos activados en el estroma desmoplástico “activado”, denominados como “fibroblastos asociados al cáncer” (*cancer associated fibroblasts*, CAFs)<sup>233, 234</sup>. *Kim et al*<sup>233</sup> desarrollaron una técnica de análisis mediante ordenador que identifica una serie

de genes que se sobreexpresan asociados a determinados fenotipos tumorales. Este perfil genético está presente en múltiples cánceres, algunos de ellos con sus perfiles genéticos adicionales propios, pero manteniendo un núcleo común. Por la presencia de proteínas como FAP y ACTA2, este perfil sugiere una variante estromal de reacción desmoplástica. Los fibroblastos activados construyen este estroma segregando colágeno, fibronectina (FN1), proteoglicanos y varias proteasas (PLAU, MMPs, etc). En su composición predominan el **COL11A1** como principal colágeno, la MMP11 como principal metaloproteína y la CDH11 como predominante cadherina, lo que indica a la existencia de una variante específica de CAFs que denominan “fibroblastos asociados a metástasis” (*metastasis associated fibroblasts*, MAFs). Se considera que facilitan el estadio invasivo inicial del proceso metastásico, y la activina A es una molécula reguladora de su activación. Este perfil genético se asocia en algunos tumores a resistencia a tratamientos neoadyuvantes<sup>233, 235</sup>.

### 3.6.4 Marcadores clínico-patológicos y estudios de imagen

Entre las variables clínicas asociadas a una mejor respuesta al tratamiento neoadyuvante están la extensión circunferencial del tumor, el grado de diferenciación tumoral, el TNM preoperatorio, el antígeno carcinoembrionario (CEA), la distancia al margen anal y el intervalo hasta la cirugía<sup>236, 237</sup>. Más recientemente se ha sugerido que la imagen de la tomografía por emisión de positrones (PET) antes del tratamiento se podría correlacionar con la respuesta.

#### 3.6.4.1 Estudios de imagen

El estadio TNM no es suficiente para predecir la respuesta<sup>53</sup>. Los estudios de imagen son más prometedores aunque la precisión disminuye después de la neoadyuvancia. El estudio MERCURY (*Magnetic Resonance Imaging in Rectal Cancer European Equivalence Study*) evaluó la relevancia pronóstica de la RM después de RQT. De los datos obtenidos parece que el grado de sustitución del tumor por fibrosis se correlaciona mejor con la supervivencia que el estadio T después del tratamiento<sup>238</sup>. Una revisión reciente apoya la idea que una combinación de estudios puede aportar información valiosa antes de la cirugía<sup>239</sup>. Un buen ejemplo es la combinación de FDG-

PET-TC y RM-difusión que, con una especificidad del 94% y una sensibilidad del 100%, predice la pCR en 22 CR<sup>240</sup>.

Los estudios de *Van Stiphout et al*<sup>237</sup> encontraron 3 variables asociadas con la pCR: longitud del tumor, estadio N, y T. La posibilidad de una pCR aumenta en tumores pequeños con bajos estadios T y N. De los resultados de la PET, hay una mayor respuesta en tumores con menor diámetro máximo, menor N, localización más alta y menor actividad metabólica máxima. Con estos datos, se desarrolla un modelo predictivo basado en datos clínicos y de la PET. En general, el tamaño tumoral en combinación con la actividad metabólica máxima es el conjunto más predictivo de respuesta. Los autores sugieren que se podría mejorar el modelo añadiendo perfiles genéticos y biomarcadores.

#### 3.6.4.2 Síntomas clínicos

Muchos estudios han evaluado mejoras en la calidad de vida en pacientes que responden al tratamiento. Varios investigadores han estudiado la correlación entre la sintomatología de la enfermedad y los resultados a largo plazo como la supervivencia y el intervalo libre de enfermedad<sup>241, 242</sup>. En un interesante estudio de *Park et al*<sup>243</sup> se intenta relacionar la sintomatología de pacientes con CR mediante cuestionarios protocolizados y su respuesta al tratamiento neoadyuvante (n=54). El estudio demuestra que de los tres síntomas predominantes (cansancio, dolor y somnolencia) la mejora en la sensación de cansancio es un factor predictor independiente de respuesta. El cansancio, de origen multifactorial, es el síntoma más frecuente en los pacientes con cáncer y es el que más interfiere con la vida diaria<sup>244</sup>.

#### 3.6.4.3 Antígeno carcinoembrionario (CEA)

En un estudio de *Yoon et al*<sup>245</sup> el análisis multivariante ha encontrado que el nivel del CEA preoperatorio es el factor predictor común de downstaging, regresión tumoral y regresión completa (pCR). De forma interesante, este estudio encuentra que la hemoglobina previa al tratamiento es factor predictor de downstaging. Sin embargo, no hay muchos estudios sobre el CEA como marcador de respuesta a RQT. *Park et al*

<sup>246</sup> encontraron en una serie de 141 pacientes que los niveles del CEA mayores de 5 ng/ml predicen una peor respuesta, en la misma línea que el estudio previamente citado. Para *Moreno García et al* <sup>247</sup> (n=148) los niveles del CEA menores de 2,5 ng/dl se asocian a mayor pCR y menos recurrencias. Esta relación ya se ha visto en otros estudios <sup>38, 248</sup>. Recientemente, *Farnault et al* <sup>249</sup> demostraron que el factor predictivo de respuesta es el CEA menor de 5 ng/ml. Otros dos factores predictivos se encuentran en el límite de la significación: el tamaño tumoral pequeño y el uso de la QT con capecitabina en vez de 5-FU endovenoso. Consideran que aunque los estudios de IHQ y genéticos tendrán un valor en el futuro, los factores predictivos clínicos no deben ser obviados.



## 4 HIPÓTESIS



En los últimos años el tratamiento neoadyuvante con RQT se ha usado de forma habitual en el CR medio y distal localmente avanzado en base a los resultados de la evidencia clínica.

La respuesta individual al tratamiento no es uniforme. Sin embargo no existe ningún método efectivo para predecir qué pacientes responderán al tratamiento. Es de gran relevancia clínica definir factores que nos puedan predecir la respuesta tumoral al tratamiento neoadyuvante. Esta información sería de gran valor ya que nos permitiría personalizar el tratamiento y el pronóstico.

La RT inhibe la proliferación celular, induce apoptosis e inhibe el crecimiento tumoral. El tratamiento quimioterápico está basado en 5-FU, un antagonista de las pirimidinas que inhibe la síntesis del ADN y la producción de ARN. La mayoría de los estudios se han centrado en moléculas que regulan el ciclo celular, la apoptosis, la proliferación y la angiogénesis como potenciales marcadores de quimio y radioresistencia. Los datos, aunque prometedores, son en ocasiones contradictorios y no han logrado establecer un marcador ó grupo de marcadores que puedan indentificar radioquimiosensibilidad en los cánceres rectales.

Los marcadores predictores podrían tener una influencia decisiva en el manejo clínico y posibilitar a muchos pacientes una cirugía local ó la simple observación. A pesar de los estudios realizados con IHQ, expresión génica, mutaciones y polimorfismos, ningún resultado se ha validado para ser incorporado a la práctica clínica.



## **5 OBJETIVOS**



1. Relación entre la expresión de marcadores moleculares (HER2, BCL-2, APAF-1,  $\beta$ -catenina, VEGF, p53, ki-67, COX-2, COL11A1) determinados con inmunohistoquímica (tissue microarrays) y la respuesta al tratamiento neoadyuvante en el cáncer de recto localmente avanzado.
2. Relación entre marcadores clínicos y patológicos (Edad, sexo, CEA, localización, grado de diferenciación, intervalo hasta la cirugía, dosis de radioterapia) y la respuesta al tratamiento neoadyuvante en el cáncer de recto localmente avanzado.
3. Relación entre la afectación ganglionar y la respuesta al tratamiento neoadyuvante en el cáncer de recto localmente avanzado.
4. Valoración de un modelo de regresión logística para la predicción de la respuesta al tratamiento neoadyuvante en el cáncer de recto localmente avanzado.



## **6 MATERIAL Y MÉTODO**



## 6.1 Sujetos objeto de estudio

Se revisaron las biopsias endoscópicas diagnósticas de 130 pacientes con adenocarcinoma de recto localmente avanzado de tercio medio e inferior, tratados con radioterapia preoperatoria con ó sin quimioterapia concomitante y cirugía radical en el Hospital Universitario Central de Asturias entre los años 2005 y 2011.

### 6.1.1 Criterios de inclusión

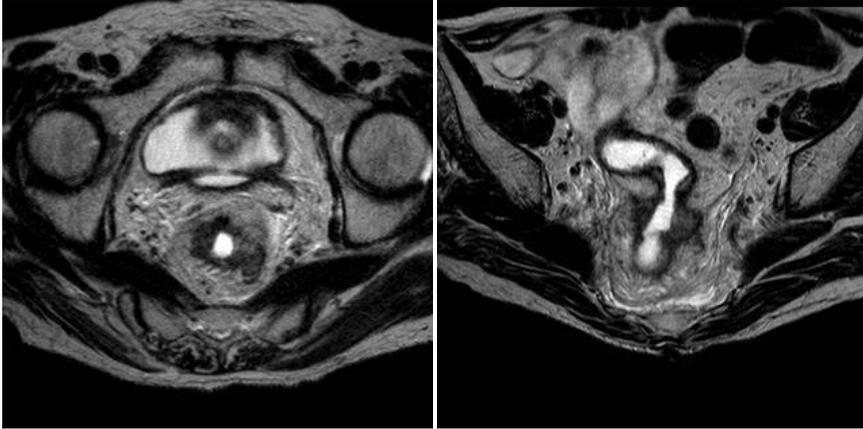
El recto se define como la porción del intestino grueso entre 2 y 16 cm del margen anal, medido por rectoscopio rígido ó RM pélvica. La localización rectal se subdivide en recto inferior (de 2 a 6 cm), recto medio (de 7 a 12 cm), y recto superior (de 13 a 16).

Cáncer de recto localmente avanzado se define como el tumor que se extiende a través de toda la pared rectal (T3-4) ó con afectación ganglionar (N+), basado en criterios clínicos y radiológicos (RM pélvica y/ó ecografía endorrectal, figuras 1-4).

Para el estudio se seleccionaron los pacientes con adenocarcinoma de recto medio e inferior con evidencia radiológica de estadio T3-4 y/ó presencia de afectación linfática N1-2 según la clasificación TNM de la UICC (*International Union Against Cancer*, sexta edición)<sup>250</sup> (Anexo 1).

### 6.1.2 Criterios de exclusión

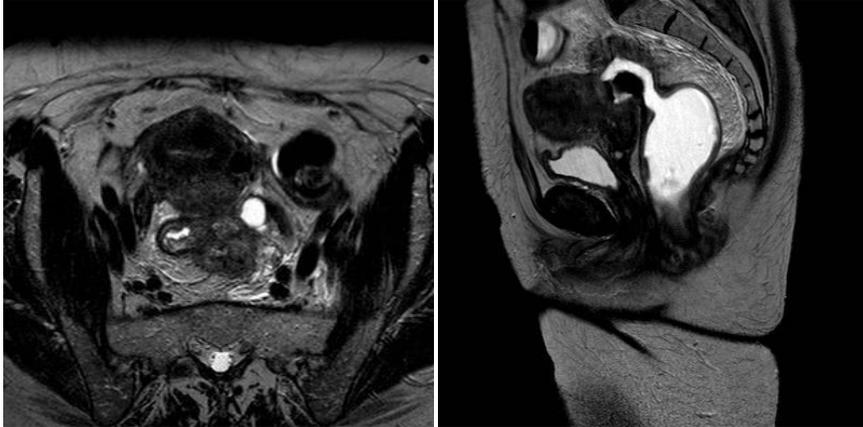
Se excluyeron pacientes con cáncer de piel y anal, tumores de recto en estadios T1-2N0, con margen distal en tercio superior, que no recibieron tratamiento neoadyuvante completo con radioterapia de ciclo largo ó hubieran recibido radioterapia previa en la pelvis. También aquellos en los que no se dispuso de registro de biopsia preoperatoria ó en los que no se realizó una cirugía radical.



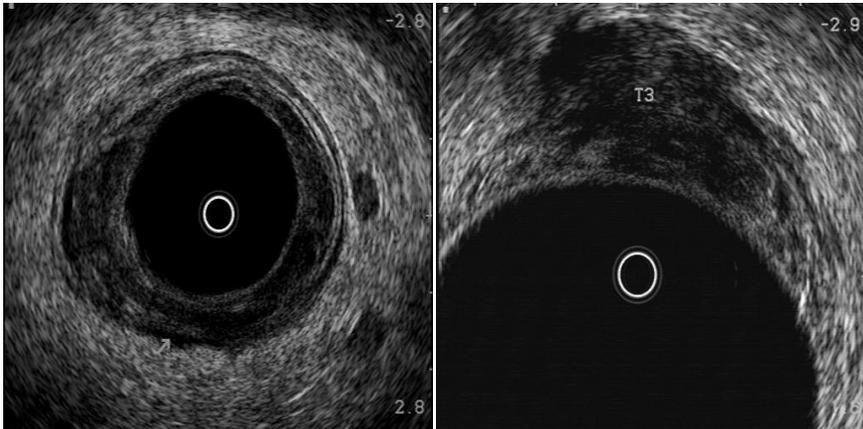
**Figura 1. RM pélvica de neoplasia de recto T3N0 (Imagen axial y coronal potenciada en T2).**



**Figura 2. RM pélvica de neoplasia de recto T3N1 (Imagen axial y coronal potenciada en T2).**



**Figura 3. RM pélvica de neoplasia de recto T4 (Imagen axial y sagital potenciada en T2).**



**Figura 4. Ecografía endorrectal de neoplasia de recto uT3N+.**

## 6.2 Protocolo de tratamiento

### 6.2.1 Estudios de extensión

Los pacientes fueron sometidos a anamnesis y exploración física completa, estudios analíticos y de marcadores tumorales, estudios de extensión con TC tóraco-abdominal, endoscopia, ecografía endorrectal y/ó RM pélvica.

### 6.2.2 Tratamiento neoadyuvante

Los pacientes recibieron radioterapia preoperatoria a nivel pélvico de ciclo largo (25 ó 28 sesiones, dosis total 45 ó 50,4 Gy) con ó sin quimioterapia concomitante basada en 5-FU.

#### 6.2.2.1 Radioterapia

##### 6.2.2.1.1 Simulación

Se localiza el tumor a tratar mediante TC que se realiza en la posición de tratamiento tras la administración de contraste oral (gastrografin). Esta posición es en decúbito prono, sobre un dispositivo que permite alejar el intestino delgado. En ese mismo acto se coloca un marcador radiopaco en el ano para mejor localización. La TC abarca toda la pelvis, haciendo cortes cada 5 mm. El sistema de láser de centraje es idéntico al de los aceleradores lineales.

##### 6.2.2.1.2 Planificación

Las imágenes obtenidas pasan a los planificadores, donde el oncólogo radioterapeuta va contorneando el volumen que debe ser irradiado (CTV) y los diferentes órganos de riesgo: intestino delgado, vejiga, esfínter, genitales, cabezas femorales, próstata, etc. Se estima el margen del volumen irradiado que debe ser diseñado para prevenir el movimiento de los órganos durante el tratamiento,

alcanzando el volumen definitivo de irradiación (PTV ó Volumen Blanco). Toda la información pasa a la Unidad de Radiofísica, donde se reconstruye en 3 dimensiones y se diseña el número de haces de irradiación para administrar la dosis en el Volumen Blanco y limitarla en los órganos de riesgo. El facultativo recibe el plan de tratamiento. Con la aprobación del plan, la Unidad de Radiofísica introduce los datos en la red interna, y los dirige a la máquina (acelerador) donde ha de tratarse (Figura 5). Antes de pasar a la red tiene dos controles de calidad y antes de poner en marcha el tratamiento debe ser de nuevo revisado por el médico responsable. El día del inicio del tratamiento, se realiza la verificación con imágenes directas de los campos de irradiación. Los datos disimétricos tienen un último control por los técnicos responsables de la aplicación del tratamiento. Posteriormente se realiza un control de imágenes al menos semanal, para garantizar la reproducibilidad del tratamiento.

#### 6.2.2.1.3 Dosis

---

Se administran 45 Gy en 25 fracciones de 1,8 Gy cada una (5 semanas, 5 sesiones por semana), al volumen que abarca el tumor primario y todas las cadenas ganglionares pélvicas a partir de la bifurcación de las iliacas.

En los casos de 50,4 Gy se finaliza con un campo más reducido que se ciñe al tumor primario a la dosis de 5,4 Gy en 3 sesiones de 1,8 Gy, administrándose por tanto una dosis total de 50,4 Gy en 28 sesiones de 1,8 Gy.

Los límites habituales a los órganos de riesgo son:

- Intestino delgado: El 90 % debe recibir una dosis menor de 25Gy.
- Cabezas femorales: El 90 % debe recibir menos de 35 Gy.
- Vejiga: El 90 % debe recibir menos de 45 Gy.
- Próstata: El 90 % debe recibir menos de 50 Gy.
- Esfínter (en tumores de tercio medio-superior): El 90 % debe recibir menos de 30 Gy.
- Genitales (en tumores de tercio medio-superior): El 90 % debe recibir menos de 30 Gy.
- Médula: El 90 % debe recibir menos de 45 Gy.

### 6.2.2.1.4 Técnica de irradiación

Se utilizan habitualmente fotones de 18 MV y técnica de 3 campos: uno posterior y dos campos laterales (con cuñas compensatorias). En algunas ocasiones se utilizan 4 campos: anterior, posterior y laterales. No obstante, en numerosas ocasiones, la Unidad de Radiofísica duplica los campos introduciendo los bloqueos precisos para limitar la dosis en los órganos de riesgo.



Figura 5. Planificación del tratamiento radioterápico.

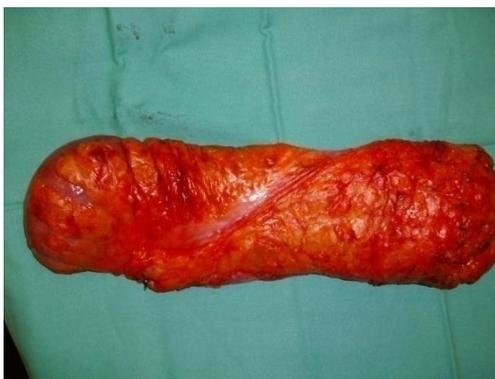
### 6.2.2.2 Quimioterapia

El tratamiento quimioterápico está basado en 5-FU, de forma habitual con capecitabina oral (Xeloda®) a dosis de 400-425 mg/m<sup>2</sup> cada 12 horas durante las semanas del tratamiento radioterápico incluyendo fines de semana a excepción de los

pacientes añosos ó “frágiles” en los que se administra de lunes a viernes. Se realizan controles hematológicos quincenales.

### 6.2.3 Tratamiento quirúrgico

Todos los pacientes fueron sometidos a cirugía radical con escisión total del mesorrecto (TME) con un intervalo variable entre 4 y 12 semanas después de la finalización del tratamiento neoadyuvante (Figuras 6 y 7).



**Figuras 6 y 7. Piezas de resección de recto con escisión total del mesorrecto.**

### **6.3 Parámetros clínico-patológicos**

Se recogieron las siguientes características clínicas e histopatológicas previas al inicio del tratamiento:

- Edad.
- Sexo.
- CEA (ng/ml).
- Estadio TNM (por ecografía endorrectal y/o RM pélvica).
- Localización tumoral (tercio inferior - medio).
- Grado de diferenciación tumoral (bien – intermedio – mal diferenciado).
- Intervalo hasta la cirugía (en semanas).
- Dosis de radioterapia (45 – 50,4 Gy).

### **6.4 Parámetros moleculares (Biomarcadores)**

Se realizó estudio con inmunohistoquímica (tissue microarrays) en las biopsias endoscópicas previas al inicio del tratamiento neoadyuvante según el siguiente panel:

- Regulador del ciclo celular: p53.
- Proliferación: ki-67.
- Apoptosis: BCL-2 y APAF-1.
- Angiogénesis: VEGF.
- Matriz extracelular: COL11A1.
- Otros: COX-2,  $\beta$ -catenina, HER2.

## 6.5 Expresión génica. Estudio de inmunohistoquímica

### 6.5.1 Técnica de tissue microarrays

La técnica consiste en tomar un pequeño cilindro de cada bloque (bloque donante) e insertarlo de forma precisa en un bloque receptor de parafina. El grosor de los cilindros utilizados es de 1 mm ya que preservan la información histológica, son representativos del tumor, permiten tener en un solo bloque múltiples muestras y producen un daño mínimo en el bloque original. Se seleccionan las áreas más representativas del tumor en los cortes de hematoxilina-eosina. Los cilindros de tejido se introducen en el bloque receptor y la homogeneización de la muestra se realiza mediante calor (Figura 8). Se anota la posición de cada cilindro, para una fácil identificación posterior. Se realizan cortes de 4 micras en portas tratados. Se dejan secar los cortes en estufa a 58°C durante 2-3 horas. Posteriormente se procede al desparafinado, hidratación y desenmascaramiento antigénico colocando las preparaciones en la solución recuperadora de antígenos con pH alto durante 20 minutos a 95°C en el PTlink®. Se procede a la programación del teñidor y tinción posterior con hematoxilina-eosina, deshidratación con alcohol y xilol, y se cubre con Entellan.

Se estudió una serie de 130 tumores. Se tomó únicamente un cilindro (en algunos casos dos) de cada bloque. El total de casos sin representación tumoral y los casos perdidos en el procesamiento se reflejan en la tabla I.

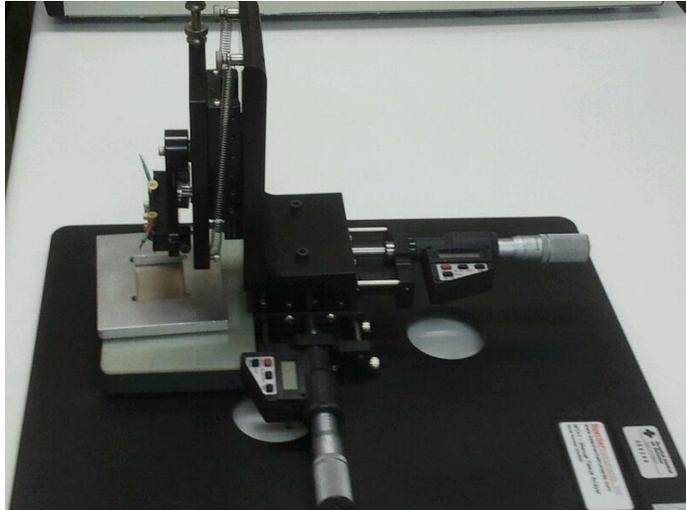


Figura 8. Aparato utilizado en la elaboración de los tissue microarrays.

<b>TABLA I</b> <b>Casos sin representación tumoral</b> <b>y pérdidas en el procesamiento IHQ</b>			
Anticuerpos	n	Anticuerpos	n
p53	12	$\beta$ -catenina	12
COL11A1	10	COX-2	26
HER2	11	APAF-1	12
VEGF	13	Ki-67	11
BCL2	13		

## 6.5.2 Anticuerpos

Para la visualización de la reacción se utilizó el sistema de detección Envision Flex y el inmunoteñidor Autostainer Link48 de Dako. Para la realización del HercepTest (HER2) se utilizó el Kit SK001 de Dako. El resto de los anticuerpos utilizados se muestran en la tabla II. El inmunosuero del procolágeno COL11A1 ha sido desarrollado por un equipo colaborador de la Universidad de Oviedo<sup>251</sup>. Se utilizaron controles positivos en todos los casos.

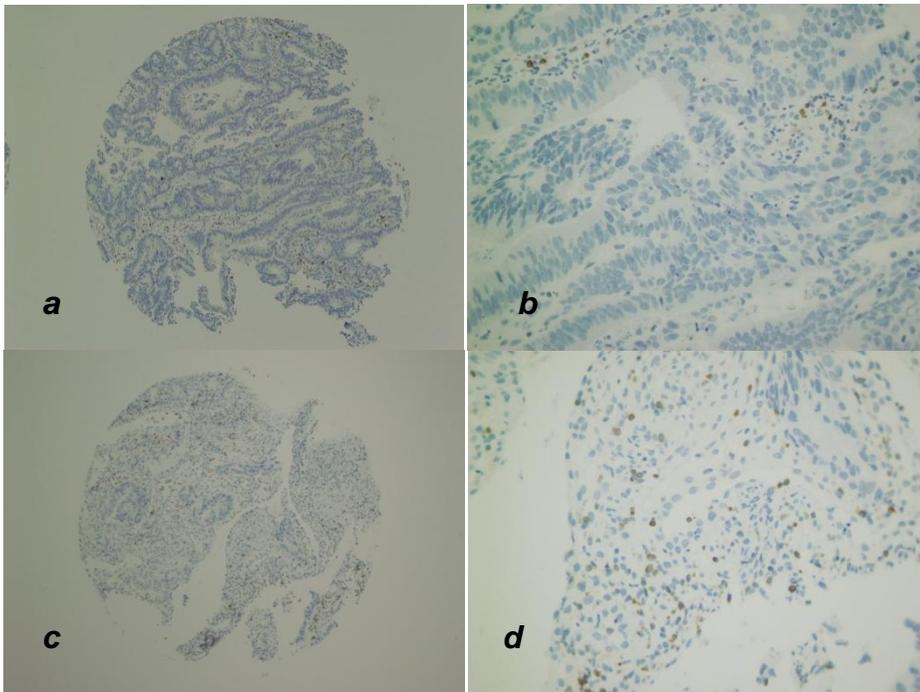
**TABLA II**  
**Anticuerpos utilizados en el estudio IHQ**

Anticuerpo	Origen	Clon	Referencia
COX-2	Dako	CX-294	M3617
APAF-1	Epitomics	Policlonal	1038-1
DMTX-(COL11A1)	Oncomatrix	1C8-33	P 0002
$\beta$ -catenina	Dako	$\beta$ -catenin-1	IR702
VEGF	Dako	VG-1	M7273
BCL-2	Dako	124	IR614
p53	Dako	DO 7	IR616
Ki-67	Dako	MIB-1	IR626

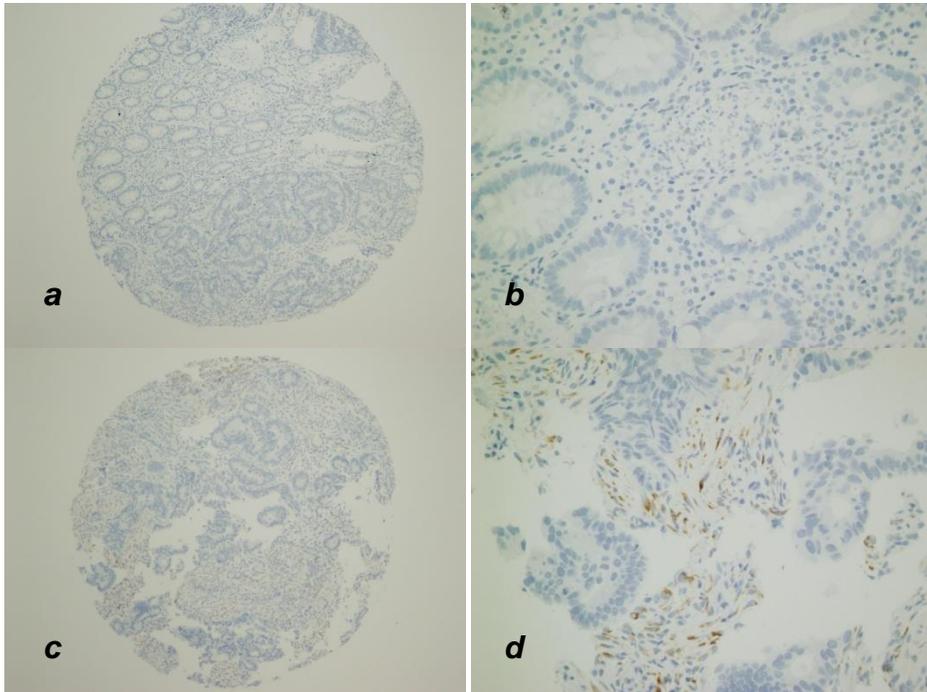
### 6.5.3 Valoración de los resultados inmunohistoquímicos

La valoración morfológica de las inmunotinciones se realizó de forma semicuantitativa. En el estudio de BCL-2, VEGF, APAF-1,  $\beta$ -catenina y COX-2 se valoró la tinción citoplasmática en las células tumorales (Figura 9). En el estudio del COL11A1 se valoró la tinción citoplasmática de los fibroblastos del estroma tumoral (Figura 10). Se consideraron cuatro valores:

- 0: ausencia total de tinción.
- 1: tinción ocasional y débil.
- 2: tinción moderada.
- 3: tinción difusa e intensa en la mayor parte de las células tumorales.



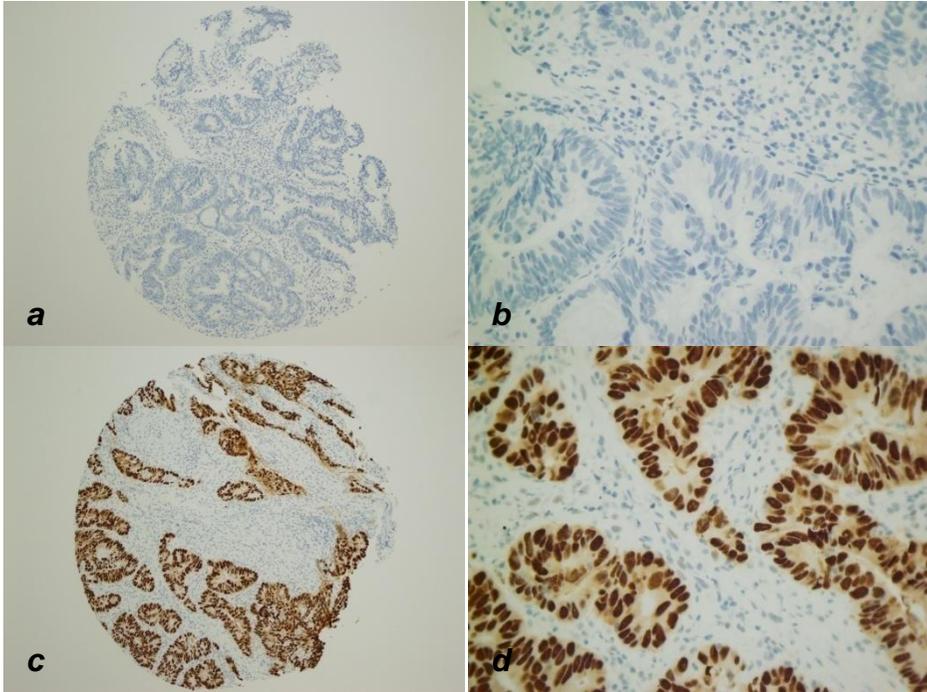
**Figura 9. Imágenes de microscopia con tinción citoplasmática de BCL-2 (a: 10x débil; b: 40x débil; c: 10x intensa; d:40x intensa).**



**Figura 10. Imágenes de microscopia con tinción de fibroblastos del estroma extracelular del COL11A1 (a: 10x débil; b: 40x débil; c: 10x intensa; d:40x intensa)**

En el estudio del ki-67 y p53 se valoró el número de núcleos teñidos de células tumorales (Figura 11) en relación a la siguiente escala:

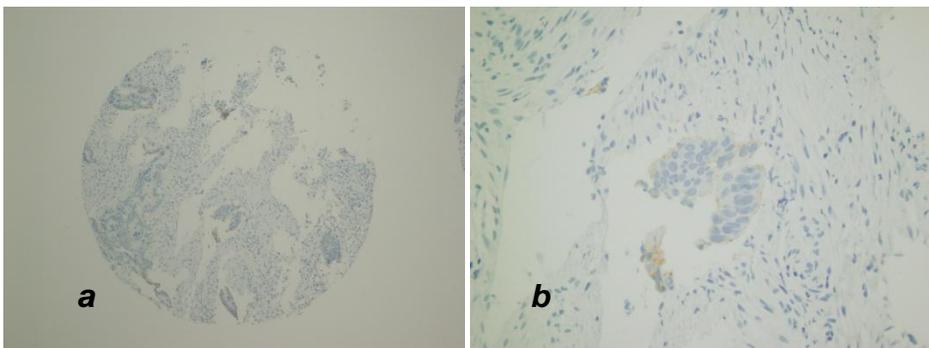
- 0 (negativo): ausencia total de tinción.
- 1 (débil): tinción ocasional y débil (menos del 20% de células).
- 2 (moderada): tinción de intensidad moderada en un porcentaje de células entre 20-50%.
- 3 (intensa): tinción difusa e intensa en la mayor parte de las células tumorales (más del 50%).



**Figura 11. Imágenes de microscopia con tinción nuclear del p53 (a: 10x débil; b: 40x débil; c: 10x intensa; d:40x intensa).**

En el estudio del HER2 se valoró la tinción de membrana de la célula tumoral (Figura 12) en relación a la siguiente escala:

- 0: Negativo.
- 1: Positivo.



**Figura 12. Imágenes de microscopia con tinción de membrana del HER2 (a: 10x positiva; b: 40x positiva).**

Para el estudio estadístico de los resultados inmunohistoquímicos, las variables se cualificaron en dos grupos, incluyendo casos negativos en un grupo y casos con cualquier grado de positividad en la tinción en otro, ó bien considerando un grupo con casos de negatividad ó tinción débil y el resto de casos (tinción moderada ó intensa) en el otro grupo. Estas cualificaciones se resumen en la tabla III.

Anticuerpo	Negativo	Positivo
p53	0	1-2-3
COL11A1	0-1-2	3
HER2	0	1
VEGF	0-1	2-3
BCL2	0	1-2-3
$\beta$ -catenina	0	1-2-3
COX-2	0	1-2-3
APAF-1	0-1	2-3
Ki-67	0	1-2-3

## 6.6 Valoración histológica de la respuesta al tratamiento neoadyuvante

La respuesta a la radioquimioterapia neoadyuvante se basa en la comparación del estadiaje clínico-radiológico previo con el resultado del estudio anatómo-patológico. Se valora la variación del estadio T (downstaging) y el grado de regresión tumoral (GRT)

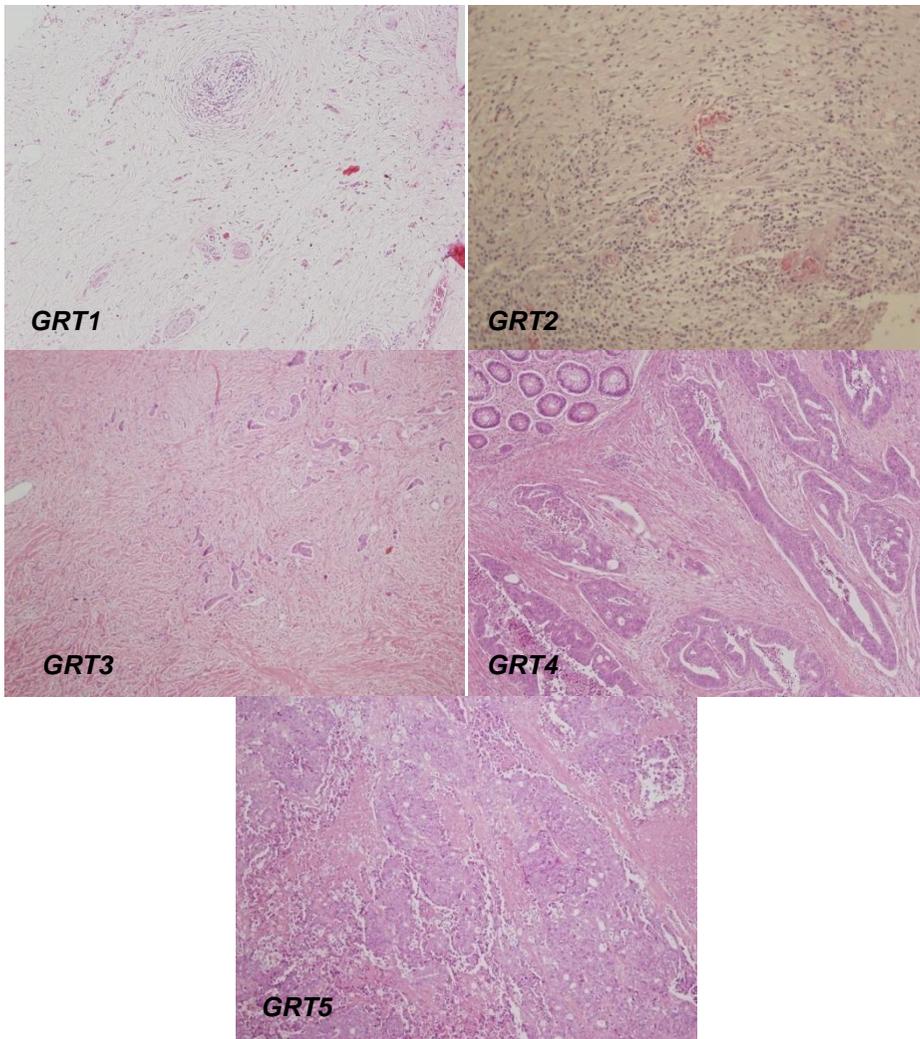
La valoración de la respuesta tumoral al tratamiento se realizó mediante el estudio morfológico de la pieza por 2 patólogos con experiencia que no tienen conocimiento de otros datos clínicos. La pieza quirúrgica resecada se fija con formaldehído al 10%, se incluye en parafina y se realizan cortes de 5 micras. Las

secciones se tiñen con hematoxilina-eosina y se usan tanto para la estadificación TNM (UICC, sexta edición, 2002)<sup>250</sup> como para la evaluación del efecto de la RQT.

La respuesta patológica completa (pCR) se define como ausencia de células tumorales en toda la pieza quirúrgica (ypT0N0). La disminución de estadio tumoral (downstaging) se evidenció por el estadiaje TNM. El downstaging se define como la reducción de al menos un nivel T (de la clasificación TNM) medido inicialmente por ecografía endorrectal y/o RM pélvica y finalmente por el estudio patológico.

Los distintos grados de respuesta (GRT) se clasificaron según el sistema adaptado de *Mandard et al*<sup>64</sup>. Este sistema se divide en cinco categorías (Figuras 13-17):

- **GRT1**, no evidencia de células tumorales, sólo fibrosis (respuesta patológica completa, pCR).
- **GRT2**, muy pocas células tumorales en el tejido fibrótico (difíciles de encontrar al microscopio), más del 50% de regresión tumoral.
- **GRT3**, predominan los cambios fibróticos con escasas células tumorales en 26-50% de la masa tumoral (fáciles de encontrar).
- **GRT4**, predominan las células tumorales pero hay fibrosis y/o vasculopatía en menos del 25% de la masa tumoral.
- **GRT5**, ausencia de cambios (sin respuesta).



**Figuras 13-17: Grados de regresión tumoral (clasificación de Mandard)**

## 6.7 Estudio estadístico

Los datos anatómo-clínicos y los resultados inmunohistoquímicos se relacionaron con los resultados de la respuesta al tratamiento. Para el estudio estadístico se empleó el programa *IBM SPSS Statistics v21* (*IBM Corporation, Somers, NY, USA*). Para el análisis univariante de las variables cualitativas se utilizaron los test de chi cuadrado (asociaciones) y correlación de *Spearman* (correlaciones). Para el análisis univariante de variables cuantitativas se utilizó el test de *Mann-Whitney*. En el estudio multivariante se establecieron dos grupos: “respondedores”, que incluyeron los GRT1 y 2, y “no respondedores” que incluyeron los GRT3, 4 y 5. Para el estudio multivariante de la regresión logística se hizo uso de la opción “Pasos hacia adelante”, mediante la cual se seleccionan aquellas variables que aportan información de manera independiente al modelo de regresión. Se consideró significativa una  $p$  menor de 0,05.

## **7 RESULTADOS**



## 7.1 Pacientes, características clínico-patológicas y del tratamiento

Se estudió una muestra de 130 pacientes que cumplían los criterios del estudio. La edad media fue de  $67,4 \pm 10,6$  años (rango 42-86). Respecto a la distribución por sexos, 87 son hombres (66,9%) y 43 mujeres (33,1%).

La localización tumoral fue 75 en recto medio (57,7%) y 55 en recto inferior (42,3%). El grado de diferenciación tumoral se recoge en la tabla IV.

TABLA IV Grado de diferenciación tumoral		
Grado de diferenciación tumoral	n	%
Bien diferenciado	68	52,3
Moderadamente diferenciado	53	40,8
Mal diferenciado	9	6,9
Total	130	100,0

Para el estadiaje previo al inicio del tratamiento está disponible la ecografía endorrectal en 119 casos y la RM pélvica en 47. En los primeros años del estudio la mayoría de los pacientes son estadiados por ecografía endorrectal. La RM pélvica es de uso habitual en los años más recientes. Los resultados se exponen en las tablas V y VI. En caso de discordancia entre ambas pruebas (10 casos) se consideró de preferencia la RM. El marcador tumoral antígeno carcinoembriónico (CEA) estuvo disponible en 83 pacientes.

**TABLA V**  
**Estadio TN por ecografía endorrectal**

Estadio TN	n	%
T3N1	53	44,6
T3N0	50	42
T4N1	9	7,6
T4N0	3	2,5
T2N1	3	2,5
T3N2	1	0,8

**TABLA VI**  
**Estadio TN por RM pélvica**

Estadio TN	n	%
T3N1	21	44,6
T3N0	12	25,5
T3N2	4	8,5
T4N0	3	6,4
T4N1	3	6,4
T2N1	2	4,3
T4N2	2	4,3

Recibieron tratamiento completo con radioterapia de ciclo largo todos los casos, 84 con dosis de 45 Gy y 46 con dosis de 50,4 Gy, por cambio en el protocolo de Oncología Radioterápica en 2008.

La mayoría de los casos recibieron quimioterapia concomitante con capecitabina oral (Xeloda<sup>®</sup>) (115 casos, 88%). Tres de ellos (2,3%) recibieron además tratamiento neoadyuvante con bevacizumab (Avastín<sup>®</sup>) e irinotecan (CPT-11) por enfermedad metastásica.

El intervalo medio entre la finalización del tratamiento neoadyuvante y la cirugía fue de  $7,1 \pm 1,1$  semanas (rango 5-12). Los procedimientos quirúrgicos están recogidos en la tabla VII.

**TABLA VII**  
**Procedimientos quirúrgicos**

Procedimientos quirúrgicos	n	%
Resección anterior baja	55	42,3
Amputación abdomino-perineal	47	36,2
Operación de Hartmann	25	19,2
Proctocolectomía total	3	2,3

## 7.2 Estudio de la respuesta al tratamiento neoadyuvante

La media de ganglios estudiados en la pieza quirúrgica fue de  $9,4 \pm 6,04$  (rango 0-38). Se observó respuesta patológica completa (pCR), ypT0N0 (GRT1), en 19 casos (14,6%) mientras que otros 18 (13,8%) presentaron sólo escasa enfermedad maligna residual en la pared rectal (GRT2). Se registró disminución del estadio T (T-downstaging) en 63 pacientes (48,5%), y hubo progresión del estadio tumoral en un solo caso. El estadiaje TNM postoperatorio se refleja en la tabla VIII.

El estudio del grado de regresión tumoral (GRT) está recogido en la tabla IX.

**TABLA VIII**  
**Estadio TN postoperatorio (ypTN)**

Estadio TN	n	%
T0N0	19	14,6
T1N0	10	7,7
T2N0	21	16,2
T3N0	38	29,2
T4N0	2	1,5
T0N1	3	2,3
T2N1	6	4,6
T3N1	16	12,3
T4N1	3	2,3
T3N2	11	8,5
T4N2	1	0,8

**TABLA IX**  
**Grado de regresión tumoral (Mandard et al)**

GRT	n	%
1	19	14,6
2	18	13,9
3	39	30,0
4	41	31,5
5	13	10,0

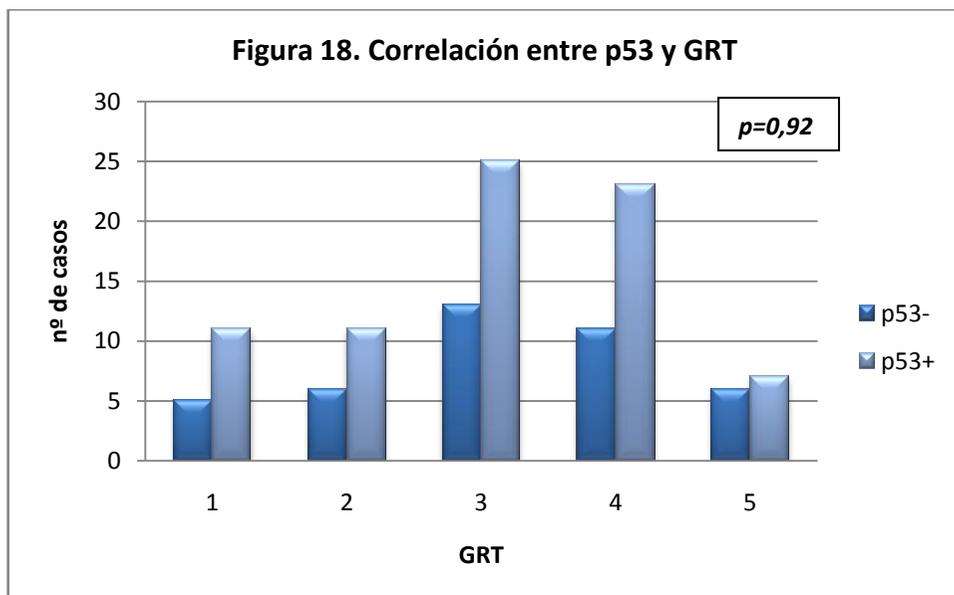
### 7.3 Estudios de inmunohistoquímica

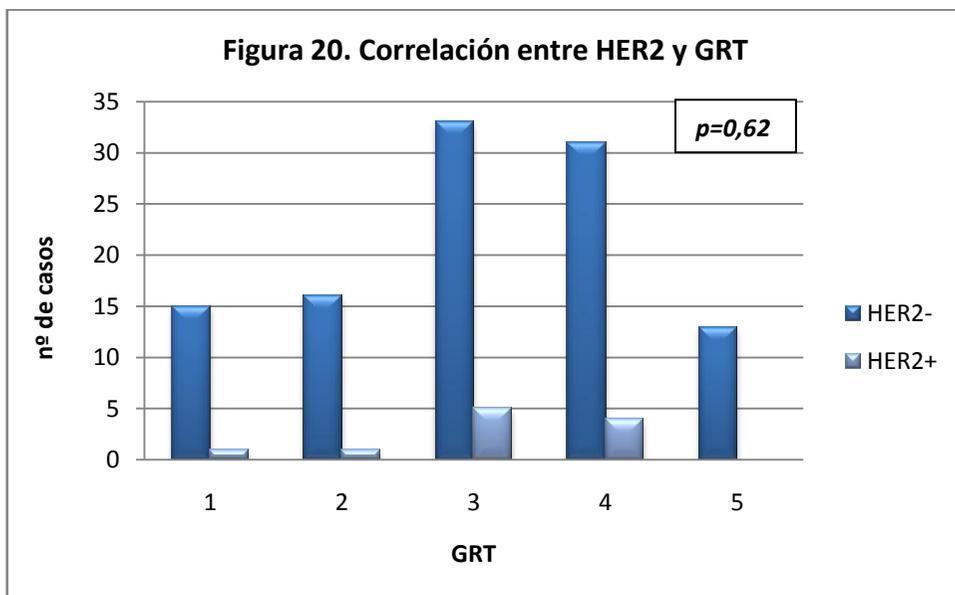
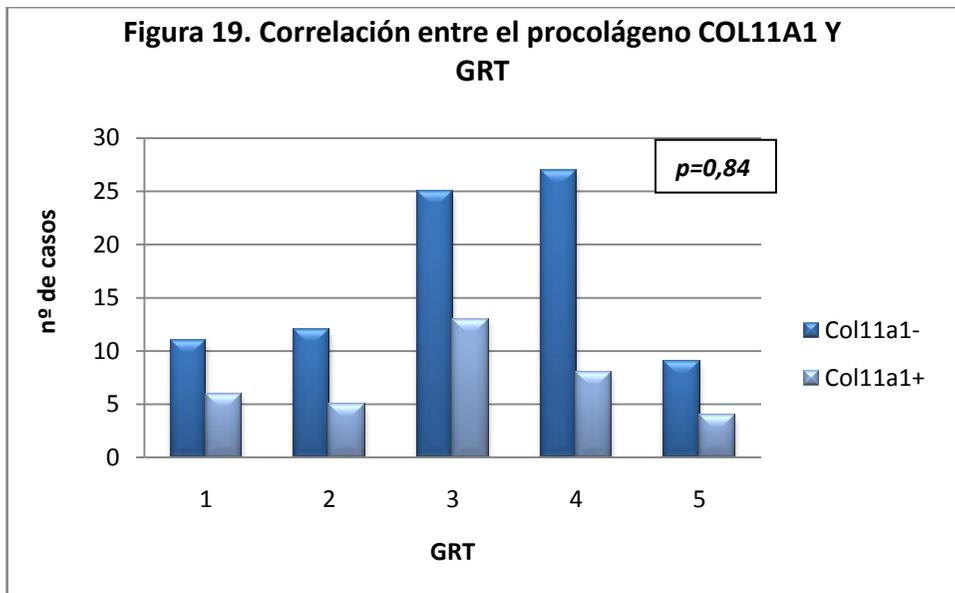
Los resultados de las inmunotinciones de las muestras están reflejados en la tabla X.

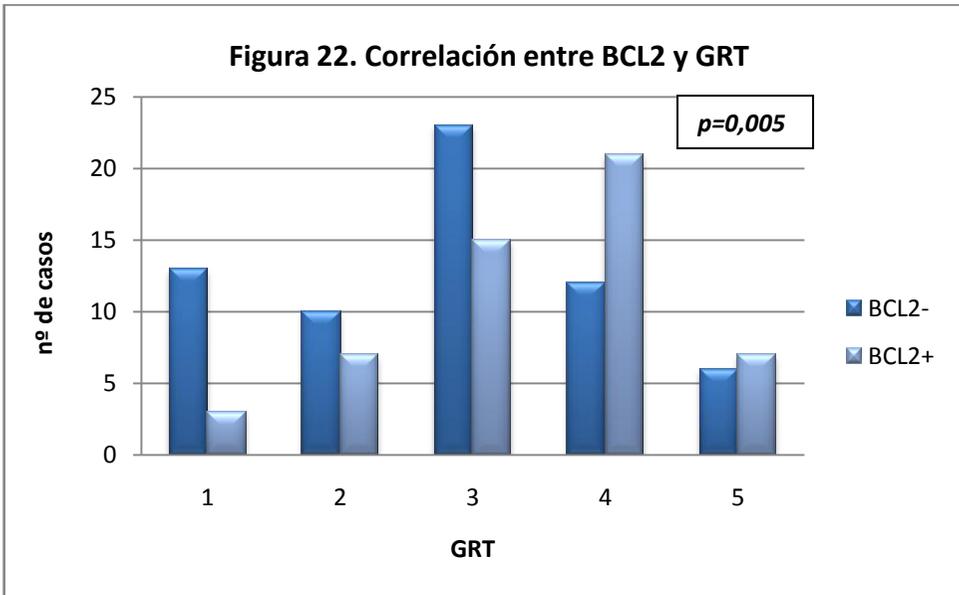
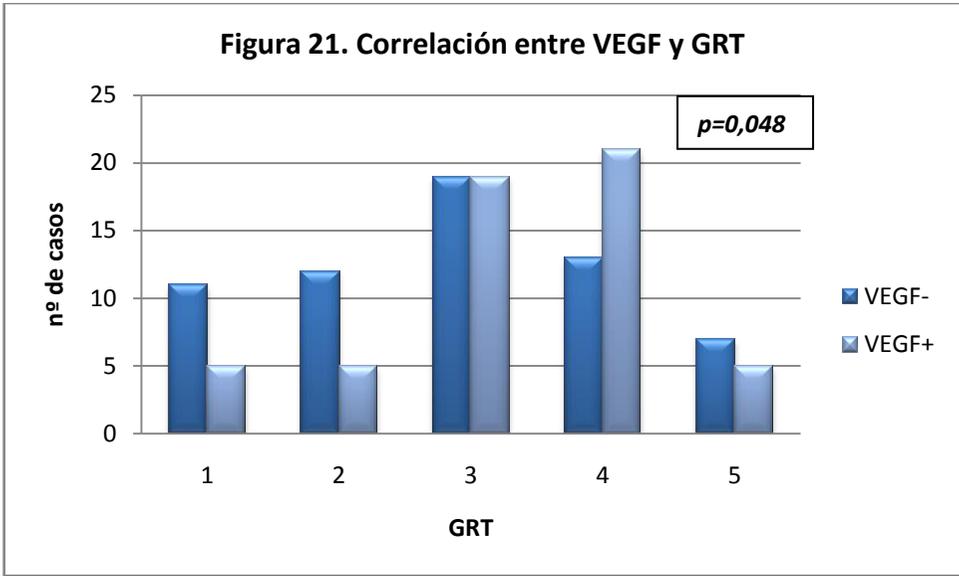
<b>TABLA X</b>				
<b>Clasificación de inmunotinciones</b>				
<b>Inmunosueros</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
p53	41	18	15	44
COL11A1	39	27	18	36
HER2	108	11	-	-
VEGF	24	38	28	27
BCL-2	64	43	9	1
$\beta$ -catenina	2	9	14	93
COX-2	56	23	16	9
APAF-1	2	10	28	78
Ki-67	5	25	25	64

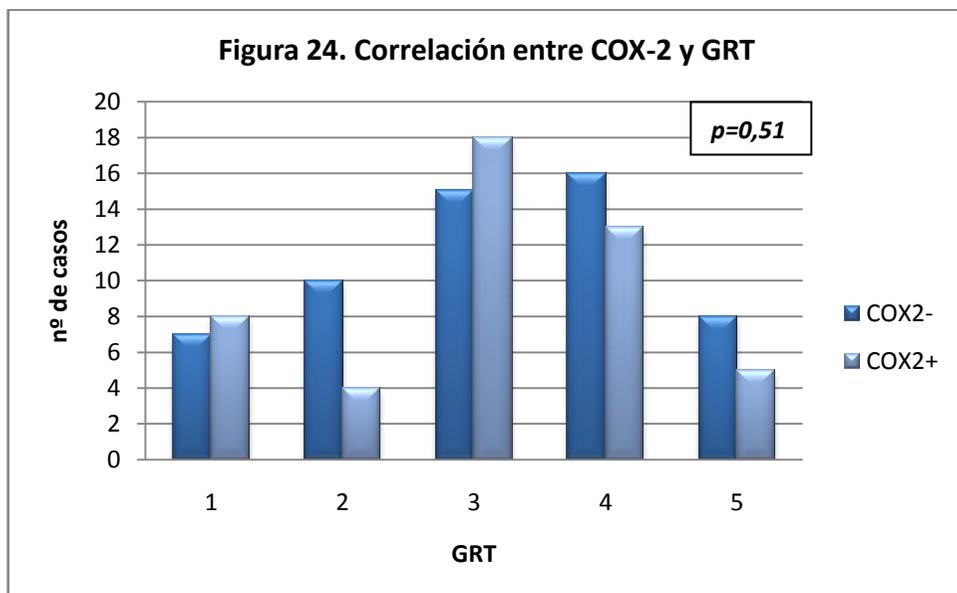
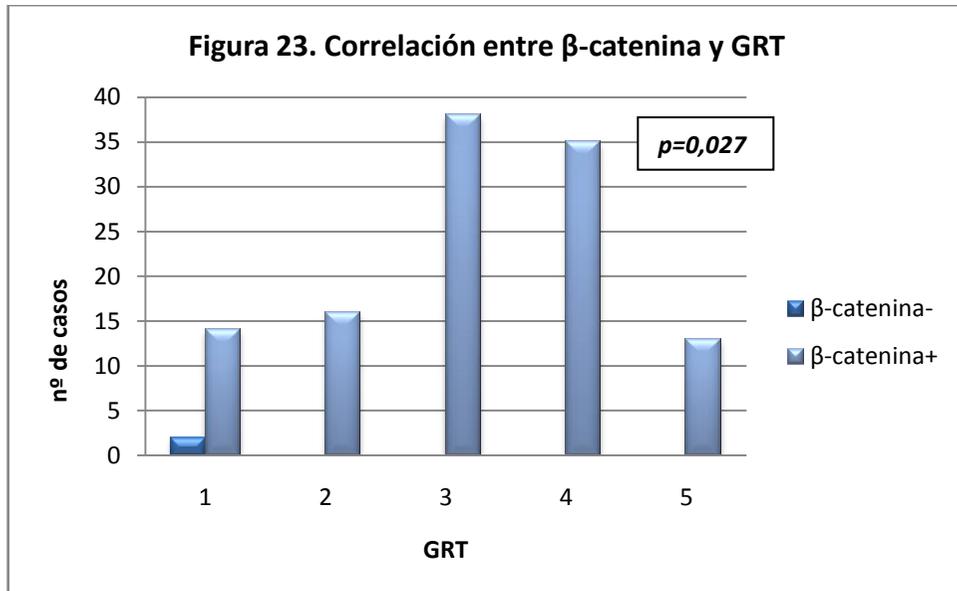
## 7.4 Biomarcadores moleculares y respuesta (GRT)

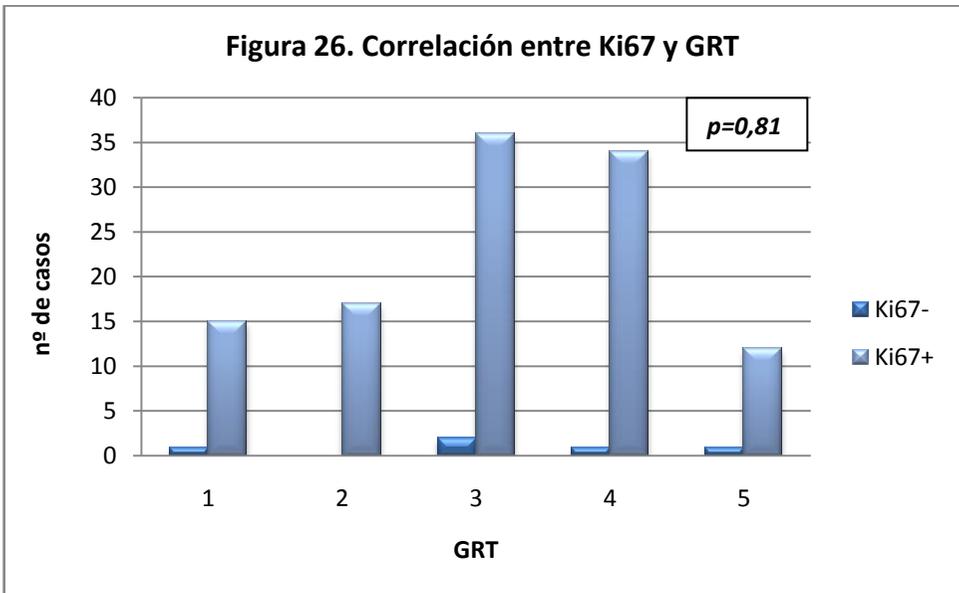
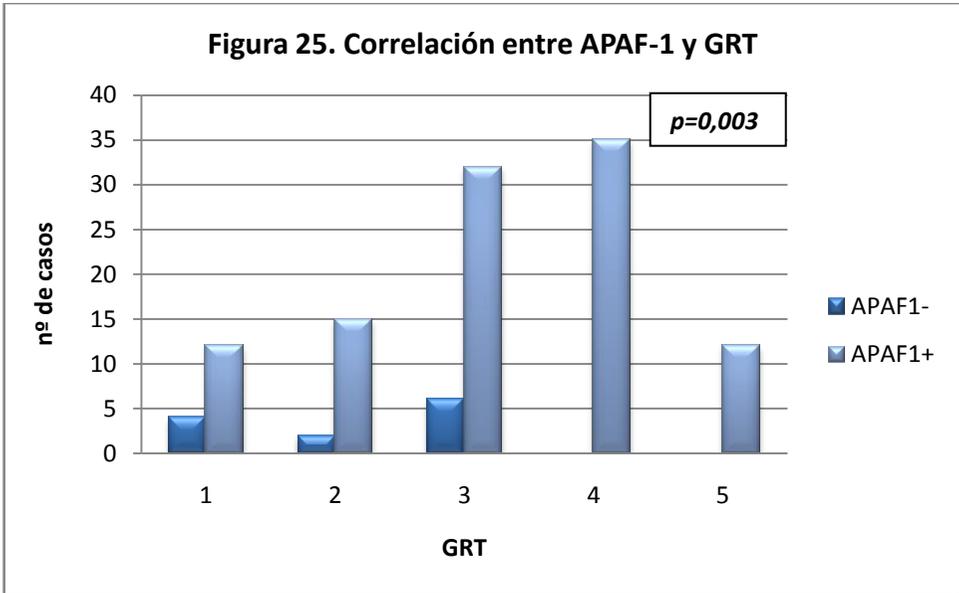
Hemos encontrado correlación significativa entre la negatividad de la expresión de Bcl-2 ( $p=0,005$ ),  $\beta$ -catenina ( $p=0,027$ ), VEGF ( $p=0,048$ ) y APAF-1 ( $p=0,003$ ) y una mejor respuesta (GRT) en el análisis univariante. Con el resto de parámetros estudiados no se ha encontrado correlación (Figuras 18-26).





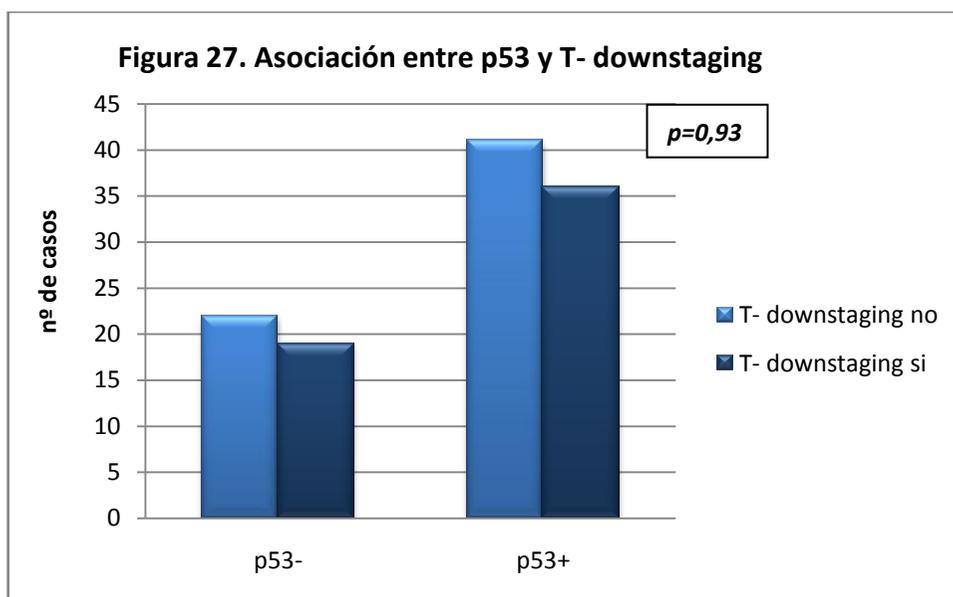




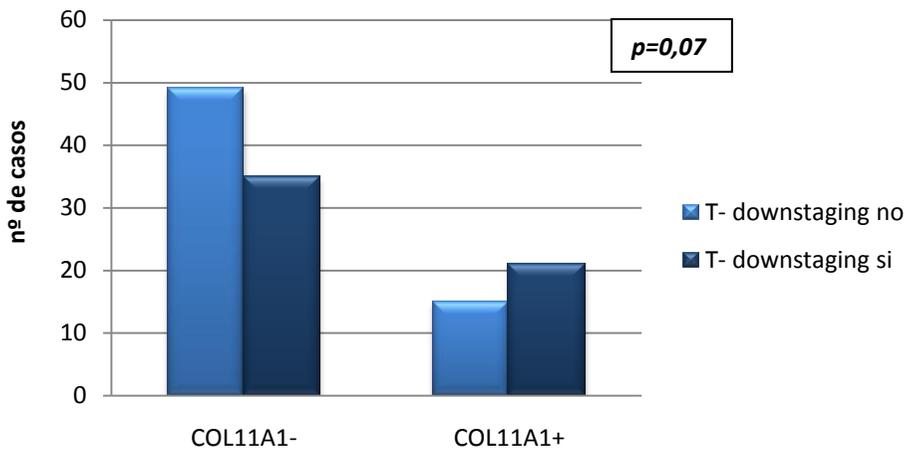


## 7.5 Biomarcadores moleculares y respuesta (T-downstaging)

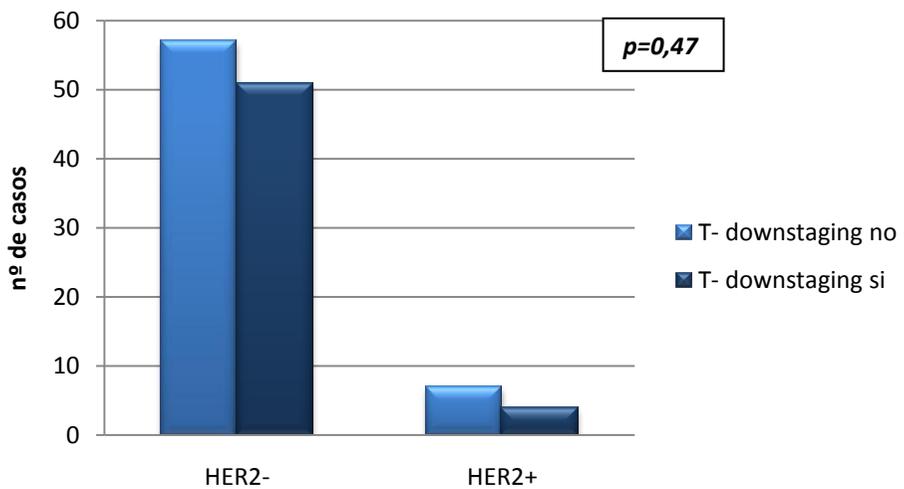
Hemos encontrado asociación significativa entre la negatividad en la expresión de VEGF y una buena respuesta (T-downstaging) ( $p=0,034$ ). Con el resto de parámetros moleculares estudiados no se ha encontrado asociación (Figuras 27-35).

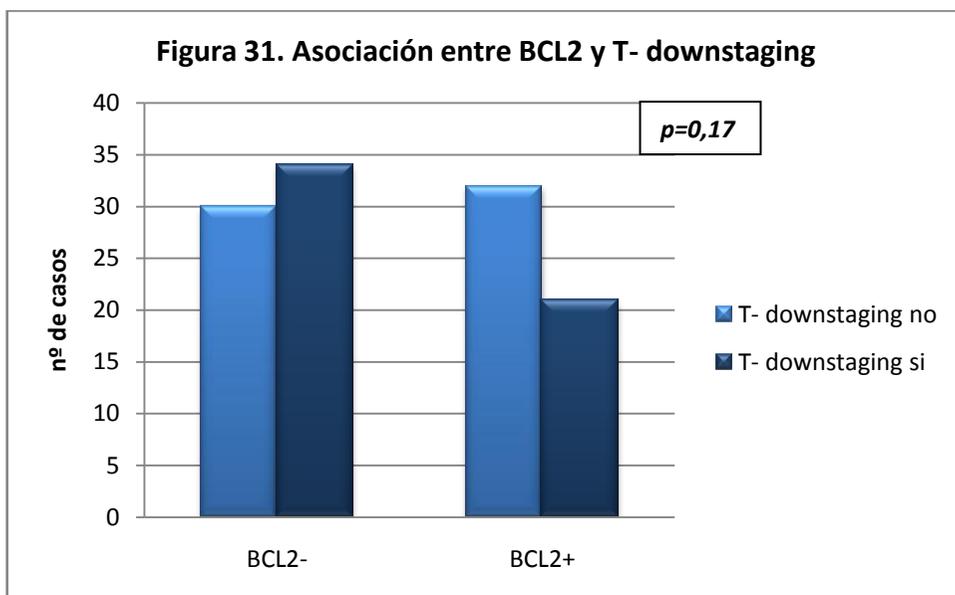
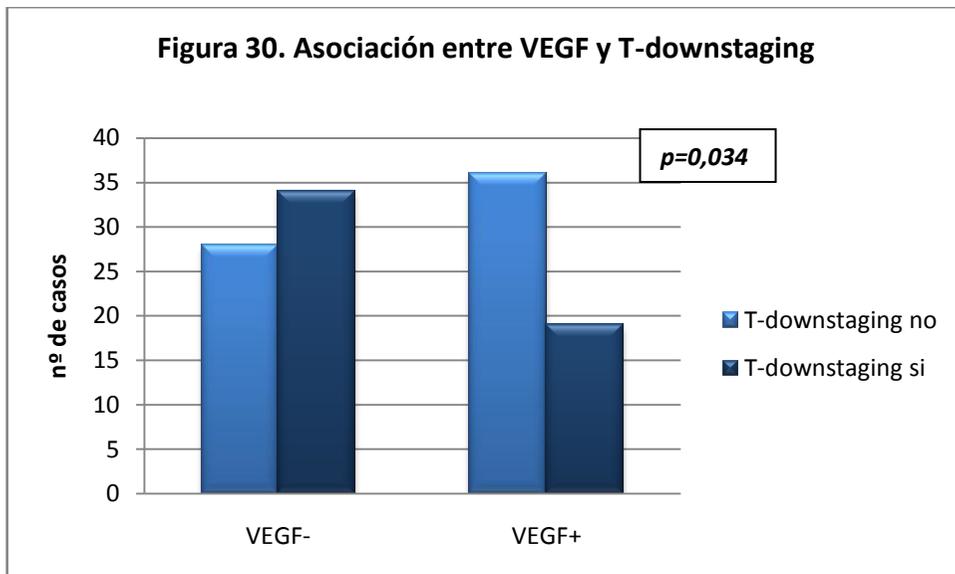


**Figura 28. Asociación entre el procolágeno COL11A1 y T- downstaging**

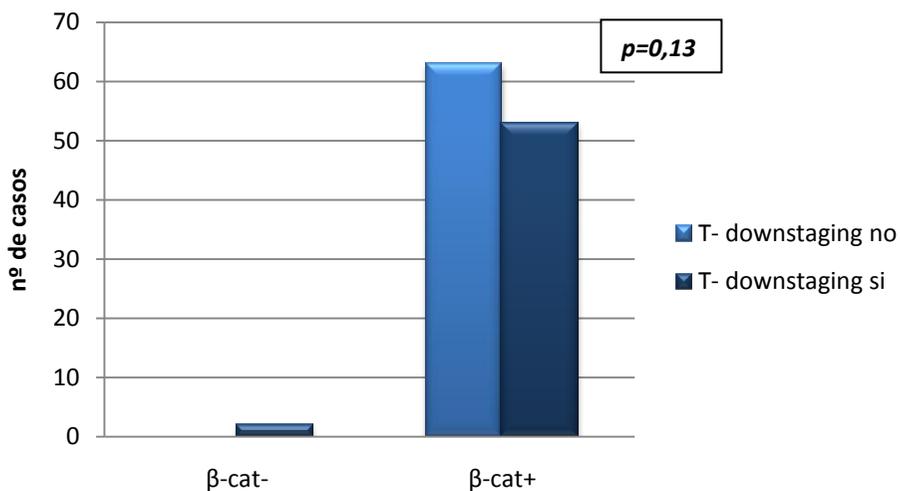


**Figura 29. Asociación entre HER2 Y T- downstaging**

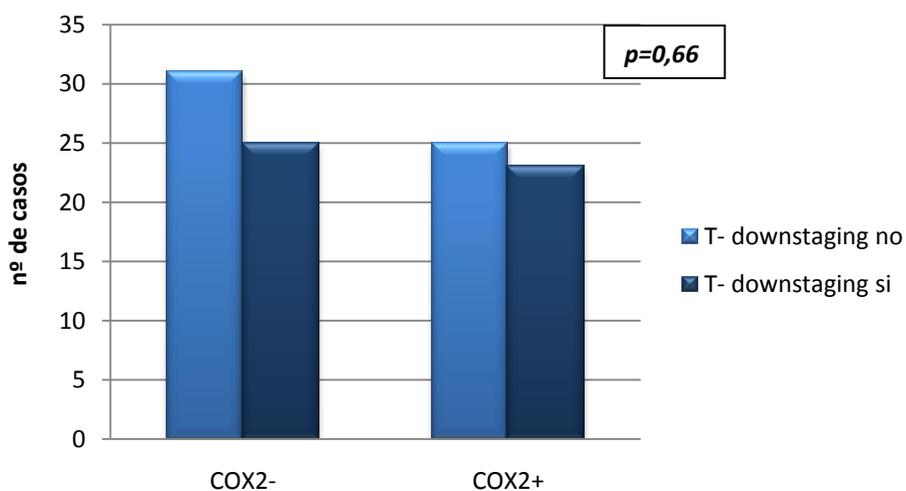


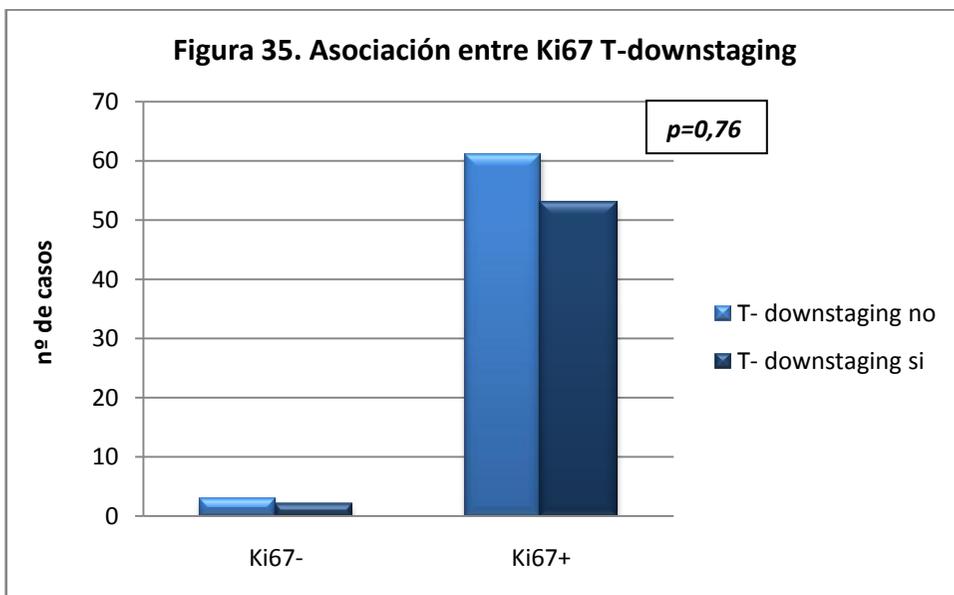
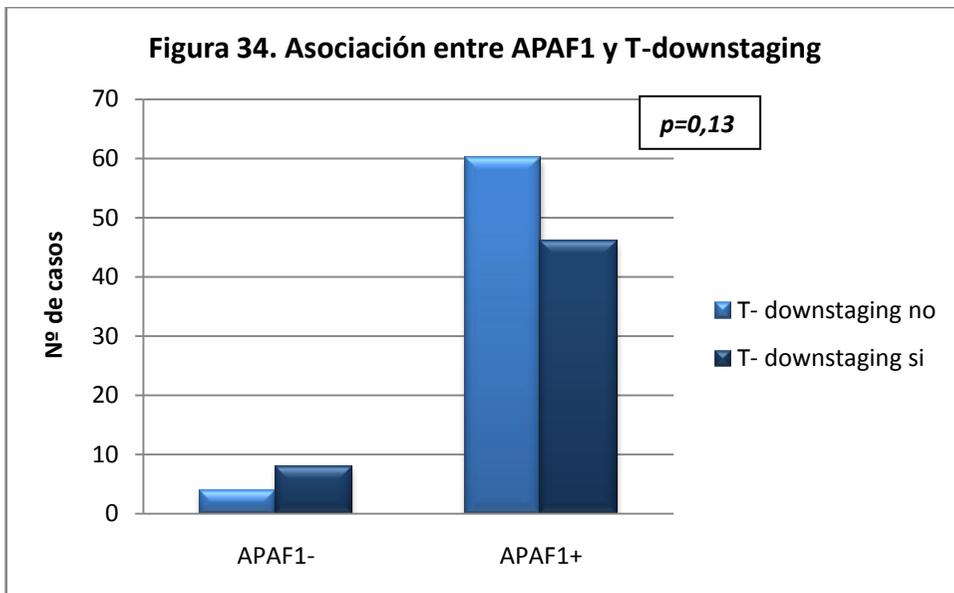


**Figura 32. Asociación entre  $\beta$ -catenina y T-downstaging**



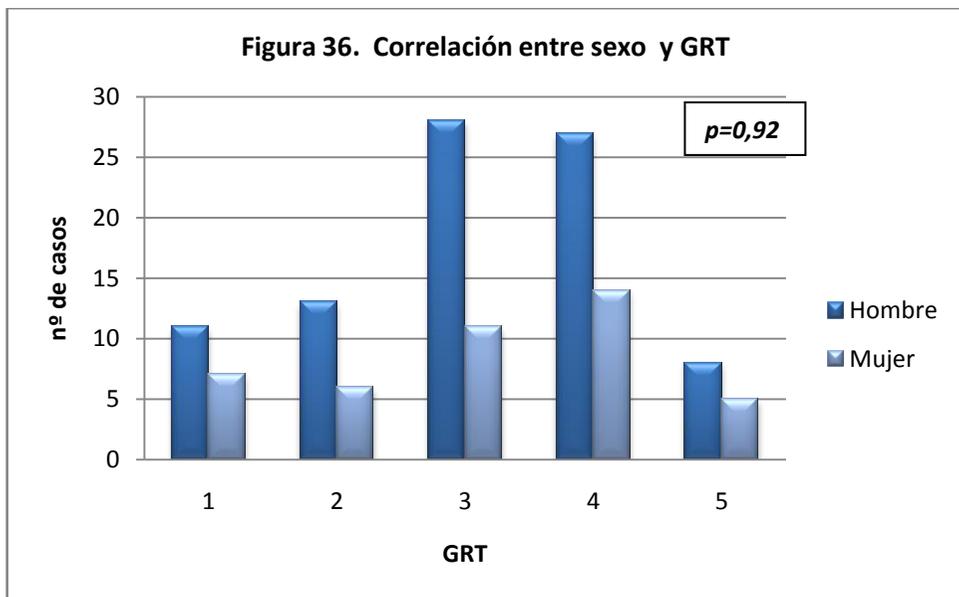
**Figura 33. Asociación entre COX2 y T-downstaging**

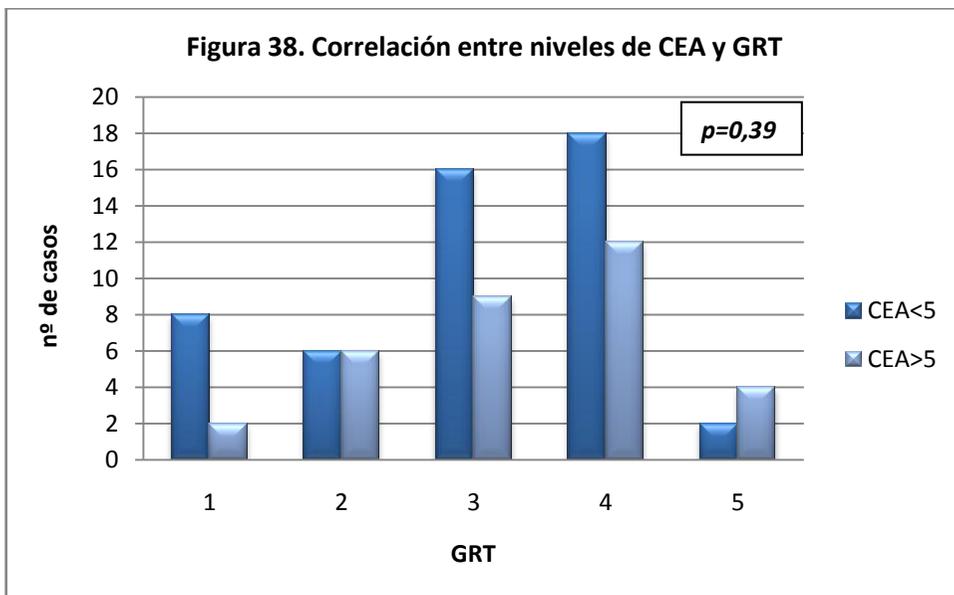
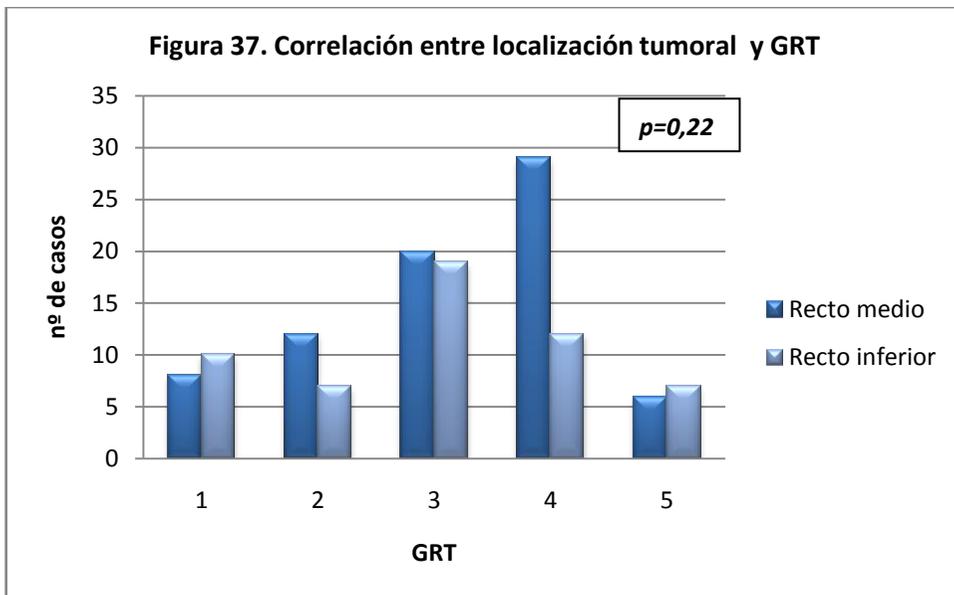




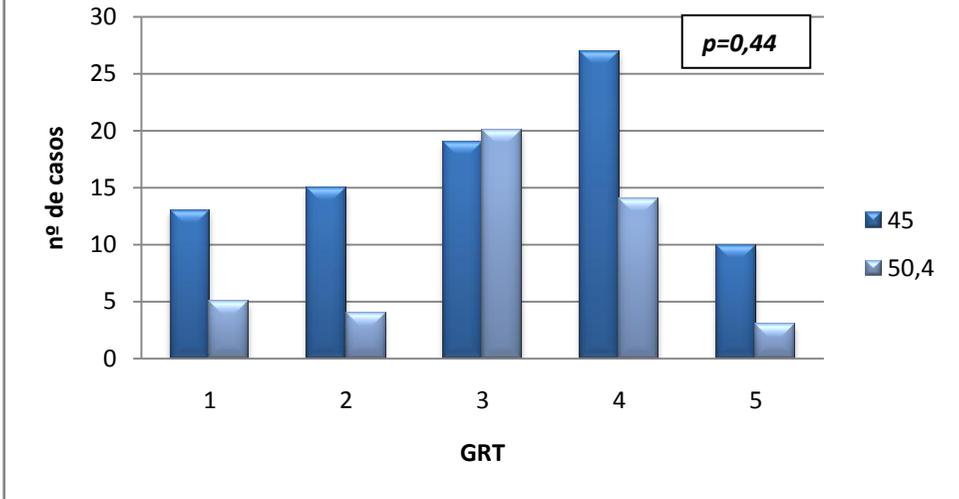
## 7.6 Características clínico-patológicas y respuesta (GRT)

No se ha encontrado correlación con diferencias significativas entre la edad, sexo, intervalo hasta la cirugía, localización tumoral, CEA, dosis de radioterapia y respuesta al tratamiento (GRT). El grado de diferenciación tumoral si es un marcador predictor de respuesta en el estudio univariante. Los tumores bien diferenciados responden mejor al tratamiento neoadyuvante ( $p < 0,001$ ) (Figuras 36-40).

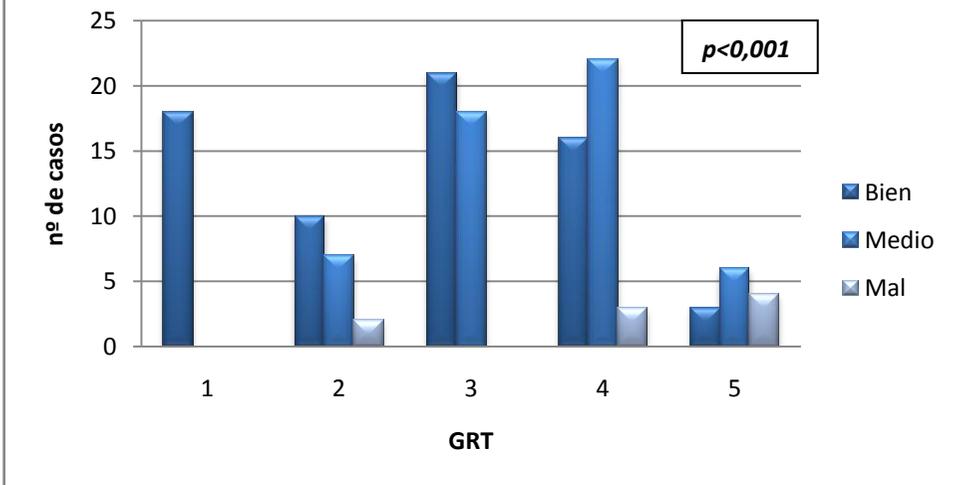




**Figura 39. Correlación entre dosis de radioterapia y GRT**

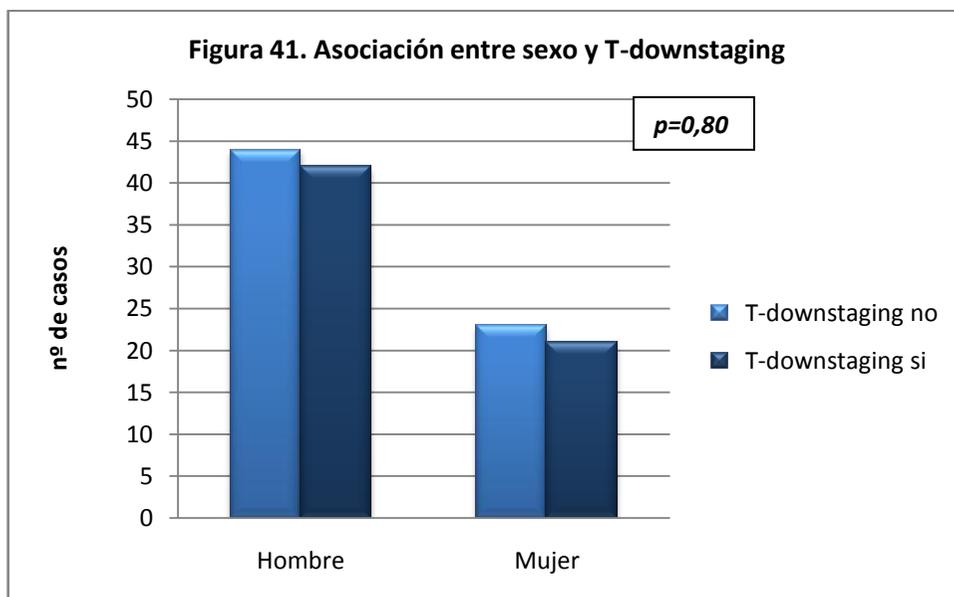


**Figura 40. Correlación entre el grado de diferenciación tumoral y GRT**

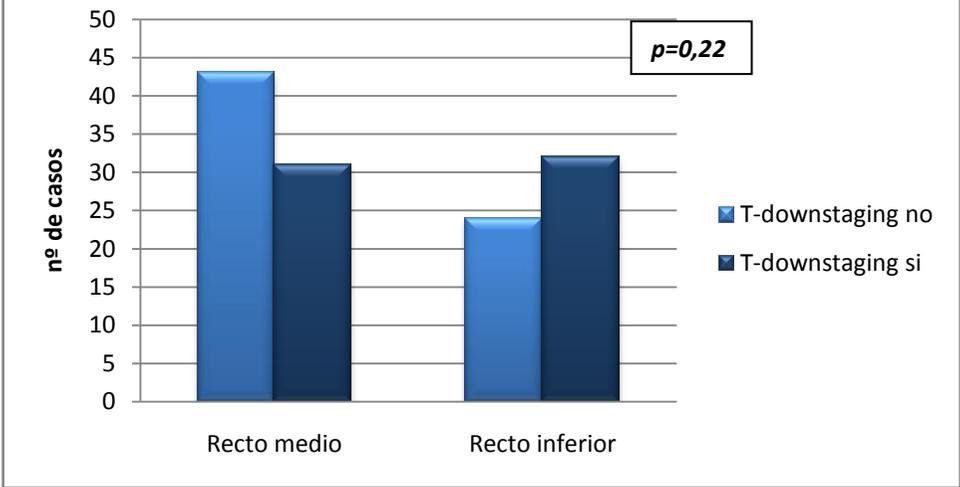


## 7.7 Características clínico-patológicas y respuesta (T-downstaging)

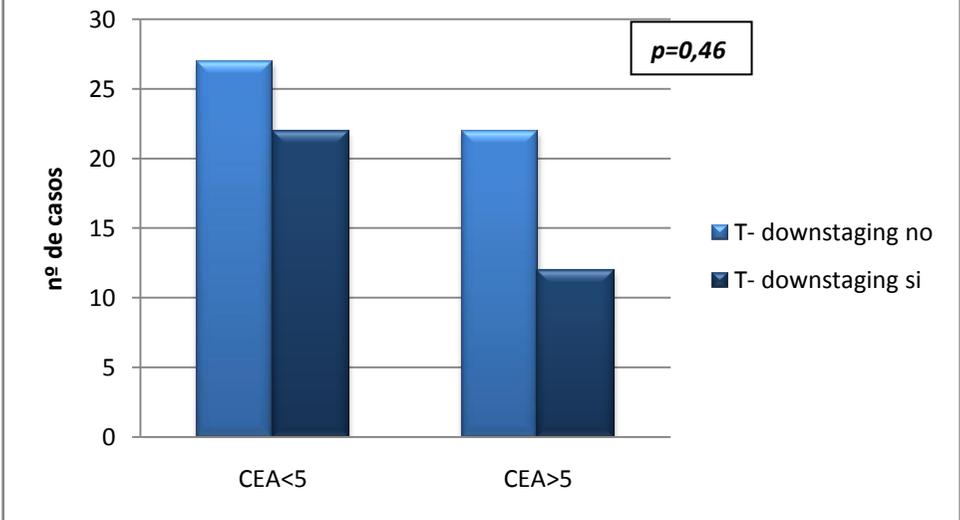
De forma similar a la valoración de la respuesta con el GRT, no hemos encontrado asociación con diferencia significativa entre la edad, sexo, intervalo hasta la cirugía, localización tumoral, CEA, dosis de radioterapia y T-downstaging. El grado de diferenciación tumoral si es un marcador predictor de respuesta en el estudio univariante, los tumores bien diferenciados responden mejor al tratamiento neoadyuvante ( $p < 0,001$ ) (Figuras 41-45).

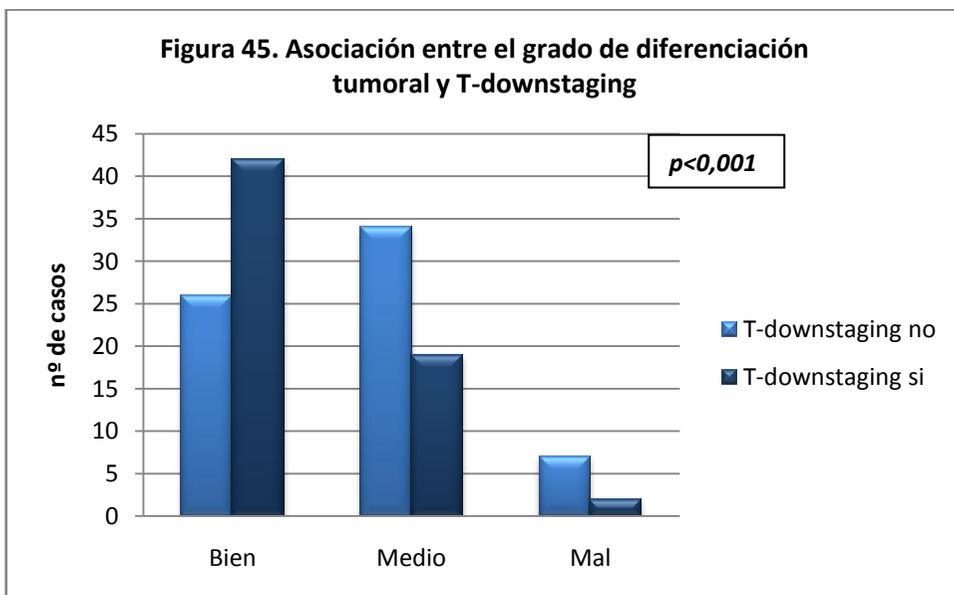
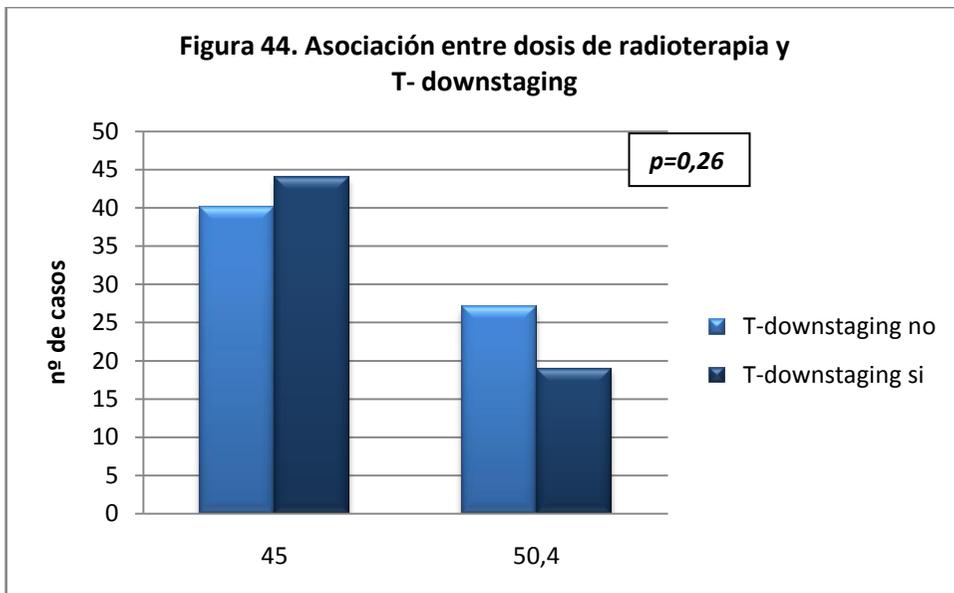


**Figura 42. Asociación entre la localización tumoral y T-downstaging**



**Figura 43. Asociación entre niveles de CEA y T- downstaging**



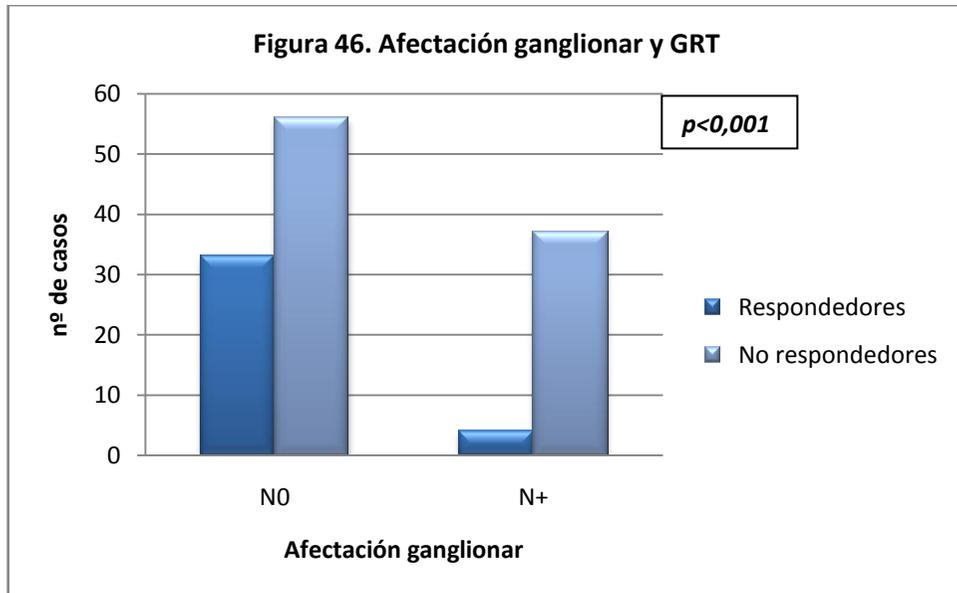


## 7.8 Afectación ganglionar y respuesta (GRT)

Como se ha comentado previamente, la media de ganglios estudiados en la pieza quirúrgica fue de  $9,4 \pm 6,04$  (rango 0-38). Se observó respuesta patológica completa (pCR), ypT0N0 (GRT1), en 19 casos (14,6%) mientras que otros 18 (13,8%) presentaron sólo muy escasa enfermedad maligna residual en la pared rectal (GRT2). Estos dos grupos se consideraron como “respondedores” al tratamiento neoadyuvante. Se registró disminución del estadio T (T-downstaging) en 63 pacientes (48,5%), y hubo progresión del estadio tumoral en un solo caso. Los resultados del estadiaje preoperatorio por ecografía endorrectal y/o RM pélvica están recogidos previamente (tablas V y VI), así como el estadiaje TNM postoperatorio que está detallado en la tabla VIII.

Se diagnosticó afectación ganglionar preoperatoria en 77 pacientes (59,2%), 71 de ellos N1 y 6 N2. La afectación ganglionar postoperatoria se observó en 41 pacientes (31,5%), 29 N1 y 12 N2, mientras que los 89 restantes fueron N0 (68,5%). Los resultados de la respuesta al tratamiento (GRT) se mostraron en la tabla IX.

De los 37 pacientes considerados como “respondedores” (GRT1 y 2), sólo hubo 4 (10,8%) con afectación ganglionar (N+), y el resto (89,2%) N0. En el grupo de los “no respondedores” (GRT3, 4 y 5) se encontraron 37 casos N+ (39,8%) y 56 (60,2%) de N0 ( $p < 0,001$ ) (Figura 46).



## 7.9 Análisis multivariante

Para el estudio multivariante de la regresión logística se han utilizado las variables clínico-patológicas edad, sexo, localización tumoral, y grado de diferenciación tumoral. Respecto a los biomarcadores, se seleccionaron COL11A1, VEGF, BCL-2,  $\beta$ -catenina, y APAF-1, que son aquellos donde hay significación ó cerca de la significación en relación con el GRT, haciendo uso de la opción “Pasos hacia Adelante”, mediante la cual se selecciona aquellas variables que aportan información de manera independiente al modelo de regresión. En el caso de la respuesta GRT las variables introducidas en el modelo como significativas han sido el grado de diferenciación tumoral y BCL-2, como se puede ver en la tabla adjunta (Tabla XI).

		CR	EE	Wald	GL	Sig	Exp (CR)
Paso 1	Grado de diferenciación			10,834	2	0,004	
	Bien	-0,762	0,857	0,790	1	0,374	0,467
	Moderado	1,006	0,944	1,135	1	0,287	2,733
	Constante	1,099	0,816	1,810	1	0,178	3,000
Paso 2	Grado de diferenciación			11,264	2	0,004	
	Bien	-0,990	0,878	1,272	1	0,259	0,372
	Moderado	0,832	0,957	0,757	1	0,384	2,299
	BCL-2 (+)	-0,946	0,472	4,020	1	0,045	0,388
	Constante	1,851	0,916	4,080	1	0,043	6,364

**Tabla XI. Estudio multivariante de la regresión logística (CR: Coeficiente de regresión; EE: Error estándar; GL: Grados de libertad; Sig: Significación; Exp: Exponencial).**

Como se puede apreciar en el paso 2 de la tabla anterior, los errores estándar de los coeficientes de las variables son en algunos casos elevados, esto es debido al número de pacientes incluidos en el modelo. Con estos resultados es matemáticamente posible calcular la probabilidad de que la variable dependiente, GRT, adquiera el valor 2 (no respondedores), utilizando la siguiente ecuación:

$$P(GRT=2) = 1 / (1 + \exp(1,851 - 0,99 * \text{Bien diferenciado} + 0,832 * \text{Moderadamente diferenciado} - 0,946 * \text{BCL-2(+)}))$$

En estas condiciones se obtienen las siguientes probabilidades en función de las diferentes combinaciones de las variables pronóstico (Tabla XII). Con este modelo de regresión logística se puede predecir en un 72% correctamente la respuesta al tratamiento neoadyuvante.

Bien diferenciado	Moderadamente diferenciado	BCL-2 (+)	Probabilidad GRT=2
Si	No	Si	0,52
No	Si	Si	0,15
No	No	Si	0,29
Si	No	No	0,3
No	Si	No	0,06
No	No	No	0,14

**Tabla XII. Diferentes combinaciones de las variables pronóstico.**



## **8 DISCUSIÓN**



Los avances más importantes en el manejo del CR han surgido después de valorar la importancia de los patrones de diseminación del cáncer, los planos anatómicos, la invasión y los márgenes negativos<sup>252-254</sup>. El desarrollo de la técnica quirúrgica (TME) y la preservación nerviosa autonómica han mejorado el control local y los resultados funcionales<sup>15, 16, 255</sup>. Con los avances en el diagnóstico por imagen hemos progresado en la identificación de la necesidad de tratamientos neoadyuvantes y adyuvantes. También ha habido mejoras en la valoración patológica de la pieza resecada, definiendo de forma detallada los planos anatómicos: el plano mesorrectal (correcto), intramesorrectal (parcialmente correcto) ó intramuscular (incorrecto). El plano quirúrgico adecuado es un factor pronóstico importante que disminuye la RL<sup>253, 256</sup>. La aceptación de la cirugía laparoscópica en el CR no es aún habitual como en el cáncer de colon, ya que en algunos estudios las tasas de CRM positivo parecen incrementarse<sup>257</sup> y los resultados funcionales empeorar<sup>21</sup>, aunque no se han demostrado diferencias en control local y metástasis a distancia en seguimientos de 3 y 5 años<sup>21, 22</sup>.

A pesar de los avances en la técnica quirúrgica, hay casos de CR donde la cirugía como único tratamiento no puede lograr un CRM negativo. Estos casos son tumores que invaden estructuras vecinas (T4) donde la neoadyuvancia está indicada. El mayor campo de discusión es determinar la necesidad de neoadyuvancia en casos donde el tumor no está fijo pero tienen alto riesgo de RL, como tumores con afectación ganglionar (N+) ó enfermedad que afecta ó está en íntima relación con la fascia mesorrectal. El tratamiento convencional para tumores localmente avanzados, clínicamente resecables (T3 y/ó N+) es la neoadyuvancia. Nuestra capacidad de identificar la N+ está limitada, lo que nos lleva a sobretratar posiblemente al 15-20% de los pacientes, como muestra el estudio alemán<sup>10</sup>, ó infratratar a un 20-30%. De forma similar, el estudio preoperatorio con RM de alta resolución con interpretación por radiólogos expertos puede ayudarnos a seleccionar pacientes que irán bien con cirugía sola<sup>258-260</sup>. Con una tasa global de RL del 6-10% para la mayoría de los CR con una óptima cirugía, el número de casos necesarios que hay que tratar con RT para prevenir una RL varía entre 10 y 18 pacientes. El subgrupo de pacientes con CR de bajo riesgo tiene una posibilidad de RL inferior al 4% y, por tanto, un tratamiento limitado parece justificado. El riesgo de RL en los casos de CR avanzados es entre 8-20%.

## 8.1 Neoadyuvancia y respuesta completa

El tratamiento neoadyuvante de RT con QT basada en 5-FU seguido de cirugía con TME se considera el tratamiento estándar del CR localmente avanzado<sup>10-12</sup>. Incluso con TME, la terapia neoadyuvante mejora los resultados clínicos en pacientes con CR. En los últimos años, al menos 7 estudios en fase III han evaluado el papel de la RT<sup>261</sup>. La biología del tumor parece jugar un papel fundamental en la respuesta al tratamiento<sup>24, 53</sup>. Tres estudios randomizados muestran que la adición de QT a la RT en el tratamiento neoadyuvante mejora el control local<sup>11, 262</sup> y la supervivencia global y libre de enfermedad<sup>263</sup>. Aunque los mecanismos responsables de la respuesta a RQT no están completamente comprendidos, la diana última de la radiación es el ADN y los agentes quimioterápicos aumentan su eficacia alterando el ciclo celular<sup>264</sup>. Las tasas de respuesta a RQT son muy variables. Alrededor del 15-40% de los pacientes son resistentes, mientras que 5-30% muestran una pCR<sup>119, 132</sup>. Nuestros resultados están en esa línea. El estadio patológico y el GRT tienen un impacto pronóstico significativo. Varios estudios relacionan el GRT con la supervivencia libre de enfermedad aunque sólo la pCR está claramente correlacionada<sup>49, 265</sup>. El GRT se ha estudiado de forma extensa. *Rodel et al*<sup>49</sup> analizaron 385 casos y encuentran diferencias significativas cuando agrupan GRT 2 y 3, pero no cuando se estratifican por estadio patológico, lo que ofrece dudas sobre la significación exacta de este factor. *Losi et al*<sup>266</sup> en 106 pacientes encontraron diferencias sólo cuando agrupan GRT 3 y 4, aunque hay una tendencia hacia una mejor supervivencia libre de enfermedad cuando el GRT está estratificado por estadio patológico. *Moreno García et al*<sup>247</sup> encontraron que tanto la supervivencia libre de enfermedad como la supervivencia global mejoran significativamente con un mayor GRT. Sin embargo, la correlación de la respuesta a la RQT preoperatoria y los resultados posteriores de RL y supervivencia es aún controvertida<sup>66, 267, 268</sup>.

En nuestra serie hemos encontrado una pCR del 14,6%. Los pacientes con pCR tienen mejor pronóstico, con un excelente control local y mejor supervivencia libre de enfermedad independientemente de su estadio TN previo<sup>11, 49, 266, 269-271</sup>. *Capirci et al*<sup>272</sup> revisan una larga serie de 566 casos en 61 centros de pacientes con pCR y encuentran mejor pronóstico en este grupo. Sin embargo, una tasa de metástasis a

distancia de 30-40% siguen siendo un problema importante. Por tanto, uno de los desafíos futuros será integrar terapias sistémicas más efectivas en los programas de tratamiento. En una revisión sistemática de estudios randomizados relevantes<sup>273</sup>, los autores concluyen que la administración de QT adyuvante en pacientes con RQT previa no está basada en la evidencia. Existen estudios con QT de inducción (CAPOX) seguida de RQT y cirugía. Aunque los resultados de resecciones R0, pCR, downstaging y GRT son similares que con RQT convencional, la tolerancia al tratamiento es mayor que en la adyuvancia y el 92% de los pacientes completan el tratamiento<sup>274</sup>.

Algunos autores consideran que en los pacientes con pCR, la adición de cirugía puede que no aporte nada al tratamiento<sup>38, 270</sup>. En este entorno, los biomarcadores pueden ser herramientas adicionales que nos permitan seleccionar pacientes para terapias más conservadoras. En algunos pacientes seleccionados con cCR, la cirugía local se ha sugerido como una alternativa, con resultados oncológicos similares<sup>37, 275, 276</sup>. Existen una serie de grupos en la actualidad estudiando la posibilidad de tratar el CR donde se consigue una cCR con escisión local u observación. El *American College of Surgeons Oncology Group* terminó recientemente un estudio de RQT antes de escisión local para CR en estadio T2N0<sup>277</sup>, y la observación (*wait and see approach*) en grupos seleccionados se está realizando en algunas instituciones<sup>37</sup>. El aplazamiento de la cirugía en pacientes con cCR también se está estudiando de forma prospectiva por el *National Cancer Research Network* americano en colaboración con la *Pelican Cancer Foundation* del Reino Unido.

Una de las grandes dudas cuando se realiza cirugía local es el estado ganglionar. Algunos estudios indican diferencias en la respuesta entre el tumor y los ganglios del mesorrecto<sup>278, 279</sup>. Según datos de la literatura, la proporción de ganglios afectados en pCR parece baja, con una mediana de 7%, variando entre 2 y 11%<sup>280</sup>. El riesgo de metástasis ganglionares en ypT0-1 es alrededor del 7% comparado con el 30% para ypT2-4 (rango 23-37%). En nuestra serie hemos encontrado una afectación ganglionar del 9,4% en ypT0-1, 22,2% en ypT2 y 43,7% en ypT3-4. Por lo tanto, la identificación de criterios predictivos relacionados tanto con el tumor primario como con los ganglios parece ser de importancia para poder seleccionar pacientes para cirugía local.

Actualmente muchos estudios se centran en la cCR después de neoadyuvancia. Sin embargo, existe una pobre correlación entre la respuesta clínica y la patológica. La pCR no se puede identificar de forma precisa ni por examen clínico ni radiológico y, en la mayoría de las veces, se realiza con datos subjetivos de la exploración<sup>278, 281</sup>. Para *Guillem et al*<sup>282</sup> el tacto rectal tiene sólo una precisión del 21% para predecir una cCR. Según el grupo de *Habr-Gama*<sup>37</sup> la reevaluación usando endoscopio y la ausencia de úlcera residual ó biopsia positiva se considera cCR. *Hiotis et al*<sup>279</sup> comunicaron un análisis de 488 pacientes usando tacto rectal y endoscopio ó ecografía endorrectal con una precisión del 25%. Muchos tumores tenían invasión en la pared ó afectación ganglionar. Las biopsias después de la neoadyuvancia tienen unas tasas bajas de predicción de pCR. En el grupo del *MD Anderson Cancer Center* llegan al 36%<sup>62</sup>. Las biopsias superficiales pueden inducir errores por la heterogeneidad tumoral. Respecto a estudios radiológicos, la precisión de la RM disminuye marcadamente después de la neoadyuvancia<sup>283</sup>. Sin embargo, con la combinación de rebiopsia y hallazgos endoscópicos se puede aumentar la tasa de predicción de pCR. En un estudio reciente, *Kuo et al*<sup>284</sup> (n=166) evalúan, después del tratamiento, 3 parámetros: RM (presencia de tumor, engrosamiento asimétrico de la pared), colonoscopia (presencia de tumor, úlcera, cicatriz fibrosa) y rebiopsia, que siempre se realiza durante la endoscopia. De los 166 pacientes, 117 tienen biopsia negativa (70%) pero solo 25 tienen pCR en la pieza reseçada (15%). En este estudio, la adición de la RM no mejoran los resultados.

En relación con estudios de imagen, la PET con <sup>18</sup>F-fluorodeoxiglucosa (FDG-PET/TC) ofrece imágenes funcionales que hacen que sea un método muy sensible para la estadificación y reestadificación de varios tipos tumorales, incluyendo el CCR, pero no puede distinguir bien una respuesta mayor de una respuesta completa. Dos metaanálisis han demostrado que la ecografía, TC y RM son muy precisas en la estadificación inicial del CR<sup>285, 286</sup>; sin embargo, para la reestadificación después de RQT, la precisión disminuye de forma importante a 30-60%, en parte por la presencia de masa por fibrosis y/ó edema. *Capirci et al*<sup>287</sup> (n=44) encuentran que la FDG-PET demuestra su potencial utilidad como un procedimiento diagnóstico complementario para la evaluación de la respuesta a RQT. En un estudio de *Cascini et al*<sup>288</sup> en 33 pacientes con CR, los cambios de la FDG-PET obtenidos 12 días después del inicio de RQT se relacionaron con la respuesta.

Una cCR no siempre se asocia con una pCR, por lo que un perfil de biomarcadores nos podría ayudar a identificar un grupo de pacientes que casi con toda seguridad no van a alcanzar pCR, y se excluirían directamente de terapias conservadoras. En esta línea, *García Aguilar et al*<sup>100</sup> han identificado mutaciones genéticas y polimorfismos que se asocian individualmente a resistencia para lograr una pCR. Encuentran que una combinación de ellos identifica un subgrupo de pacientes que no alcanzarán pCR con un alto grado de exactitud.

## 8.2 Marcadores clínico-patológicos y respuesta

Entre los estudios que han analizado las características clínico-patológicas del paciente y el tumor, en la mayoría de ellos no se han identificado correlaciones<sup>269</sup>, mientras que en otros se ha visto asociación con el grado histológico ó el tamaño tumoral<sup>68, 289</sup>. En la mayoría donde constan, el estadio T y N inicial, el grado de diferenciación, la edad y el sexo no son factores predictores<sup>128, 290</sup>. Sin embargo, algunos de ellos pueden tener influencia en el riesgo de RL, como el tamaño tumoral ó su extensión circunferencial. El grado de afectación de la circunferencia rectal y la distancia al margen anal se han relacionado con la respuesta tumoral, pero los resultados son contradictorios<sup>236, 245</sup>. Nosotros no hemos encontrado asociación entre el intervalo hasta la cirugía y la respuesta, pero algunos autores han demostrado que un intervalo superior a 8 semanas se asocia a mayor tasa de pCR<sup>291, 292</sup>.

*Janjan et al*<sup>289, 293</sup> (n=117) observaron que el único factor predictivo de respuesta completa era el tamaño tumoral y que dicha respuesta era predictiva de mejor supervivencia global. En nuestro estudio hemos encontrado una buena respuesta (GRT1-2) en 28,5% y T-downstaging en 48,5%. No hemos encontrado correlación con los parámetros clínicos estudiados a excepción del grado de diferenciación tumoral. En la misma línea, *Farkas et al*<sup>291</sup>, no encontraron correlación con parámetros clínicos ni radiológicos previos al tratamiento, y un 48% mostraron una buena respuesta (GRT1-2). *Molinari et al*<sup>93</sup> (n=51) tampoco encontraron correlación entre la respuesta y los parámetros clínicos estudiados.

La elevación preoperatoria del CEA se asocia en CCR con mayor riesgo de recaída y peor pronóstico<sup>294</sup>. El valor predictivo del CEA sérico como marcador de respuesta a la neoadyuvancia en el CR ha sido evaluado en varios estudios. *Farnault et al*<sup>249</sup> (n=168) encontraron una tasa de pCR de 19% y downstaging de 56%. El factor predictivo de respuesta fue el CEA menor de 5 ng/ml. Esta relación también ha sido observada por otros<sup>247, 248</sup>. *Lee et al*<sup>295</sup> encontraron diferencia significativa entre los niveles de CEA en análisis univariante, con mejor respuesta si el CEA es menor de 5 ng/ml (20,5 vs 6,1%, p=0,01). Otro conflicto surge del nivel de corte del CEA sérico, ya que algunos proponen 5 ng/ml y otros 2,5 ng/ml. *Park et al* con 141 pacientes<sup>246</sup>, encontraron asociación entre niveles mayores de 5 ng/ml y peor respuesta. Los resultados del estudio de *Yoon et al*<sup>245</sup> están en la misma línea tanto en el análisis univariante como multivariante. Posiblemente en la mayor serie de la literatura donde se estudiaron factores predictores básicamente clínicos (n=562) sea la de *Das et al*<sup>236</sup>. Encontraron un 19% de pCR, 20% de tumor residual microscópico, y 57% de downstaging. En el análisis univariante, el nivel de CEA mayor de 2,5 ng/ml y la afectación circunferencial mayor del 60% se asociaron a peor respuesta. También la distancia al margen anal mayor de 5 cm se asocia a peor downstaging. En el análisis multivariante sólo la afectación mayor del 60% fue un factor independiente de mala respuesta. Para *Moreno García et al*<sup>247</sup> (n=148), los niveles de CEA menores de 2,5 ng/dl se asociaron a mayor pCR y menos recurrencias. Estos autores consideran este nivel de corte más útil para su uso en la práctica clínica habitual. Nosotros hemos estudiado el nivel de CEA y su posible asociación con la respuesta y no hemos encontrado resultados significativos en ningún nivel de corte (2,5 y 5 ng/ml). El nivel de CEA puede cambiar con el tratamiento. En ocasiones disminuye en relación a la disminución de la masa tumoral; en otras ocasiones puede aumentar. Sobre estos cambios hay pocos estudios. *Park et al*<sup>296</sup> han encontrado que el mantenimiento del nivel de CEA alto es un factor de riesgo de recurrencia sistémica. *Larsen et al*<sup>297</sup> encuentran menor RL en los pacientes con disminución del CEA después de neoadyuvancia. *Pérez et al*<sup>248</sup> mostraron que la disminución del nivel de CEA hasta nivel normal después del tratamiento se asocia con mejor supervivencia, pero no la simple disminución, de acuerdo también con el estudio de *Isihara et al*<sup>298</sup>. Incluso con N0, los pacientes con CEA elevado después de neoadyuvancia tuvieron alto riesgo de recurrencia. En este estudio la supervivencia no se asocia al T-downstaging ni al grado de regresión.

Los estudios de imagen para la estadificación del CR han pasado de centrarse exclusivamente en la determinación del TNM a tratar de definir una serie de factores pronósticos: profundidad de afectación mural/extramural, distancia al margen mesorrectal, afectación ganglionar, vascular, peritoneal ó del complejo esfinteriano<sup>299</sup>. La realidad tumoral representa modelos patológicos muy complejos y variables y muchas de estas características pueden ser evaluadas mediante técnicas de imagen funcionales ó moleculares. Los tumores T3 son muy heterogéneos. No debemos confundir la fascia mesorrectal con el CRM (definido después de la cirugía). La invasión vascular extramural se encuentra presente hasta en un 30%. La estadificación ganglionar por medios de imagen es muy limitada. Algunas técnicas de imagen moleculares y funcionales disponibles supondrían un complemento a la evaluación morfológica: angiogénesis (perfusión-TC ó RM-dinámica), celularidad (RM-difusión) y metabolismo celular (PET). En la evaluación de la respuesta al tratamiento, tanto la perfusión-TC como la RM-dinámica muestran cambios en sus parámetros y parecen capaces de evaluar de modo precoz la respuesta tumoral a fármacos. La RM-difusión se presenta como una técnica emergente, proporciona información biológica sobre distintos factores como la densidad celular y otros<sup>300</sup>. En el CR las imágenes han mostrado su utilidad en la delimitación del volumen tumoral y unos de sus principales campos de aplicación sería predecir la respuesta al tratamiento<sup>301</sup>. La PET presenta una pobre resolución espacial. La PET/TC ha mostrado utilidad en el diagnóstico, seguimiento, detección de recurrencias y metástasis. Sus limitaciones en el CR están en tumores pequeños, mucinosos ó necróticos con poca actividad metabólica que pueden ser falsos negativos y procesos inflamatorios que pueden causar falsos positivos. La PET con uso de FDG ó fluorotimidina (radiotrazador para estudio de proliferación celular) podría permitir una evaluación precoz de la respuesta<sup>302</sup>, lo que abriría una puerta a su uso en el CR. Publicaciones más recientes han establecido la importancia de combinar la información de distintas técnicas para una mejor comprensión de la biología tumoral<sup>303, 304</sup>. Uno de los puntos centrales en el CR es la respuesta a la neoadyuvancia. Las técnicas convencionales aportan una evaluación limitada y poco correlacionable con los hallazgos patológicos. Las técnicas combinadas (imágenes multiparamétricas) podrían representar una opción más adecuada. En un estudio de 35 pacientes, *Jung et al*<sup>305</sup> demuestran que el volumen tumoral y el porcentaje de disminución de este volumen difieren significativamente entre respondedores y no respondedores. El valor del coeficiente de difusión aparente (ADC)

antes del tratamiento, que proporciona información en relación a la celularidad tumoral y la integridad de las membranas celulares, fue significativamente menor en respondedores.

El estadio ypT y el ypN es el factor predictor de resultados más importante en el CR. La invasión linfática y vascular, la afectación de la circunferencia, la distancia al margen anal y otros como los niveles de hemoglobina, son ejemplos de factores clínicos y patológicos que han mostrado resultados conflictivos<sup>265</sup>. *Guedj et al*<sup>306</sup> (n=40) encontraron que los tumores de los pacientes respondedores son con mayor frecuencia planos con ó sin ulceración y con menos invasión vascular, neural y menos necrosis. Estos datos están en línea con los de *Ratto et al*<sup>307</sup>. *Bouzorene et al*<sup>308</sup> sin embargo encontraron que los tumores con mayor necrosis tienen mayor regresión. *Berger et al*<sup>68</sup> encuentran que la RT es más efectiva en pacientes con adenocarcinomas bien diferenciados, en la misma línea que nuestros hallazgos. También en el estudio de *Suzuki et al*<sup>309</sup> se encuentra una tendencia, pero sin significación estadística (p=0,06).

### **8.3 Marcadores moleculares y respuesta**

Los parámetros que condicionan el tratamiento preoperatorio se basan en el estudio de extensión de la enfermedad, pero no tienen un impacto predictivo en la respuesta. Los estudios genómicos y proteómicos nos permiten el reconocimiento y ayudan a mejorar la comprensión de la heterogeneidad tumoral. Es lógico postular que las tecnologías moleculares nos llevarán al desarrollo de mejores modalidades de screening y tratamientos individualizados. Existen diferencias intrínsecas en lo referente a la radiosensibilidad y el conocimiento de sus bases biológicas nos puede ayudar a desarrollar pruebas predictivas y nuevas estrategias de tratamiento. La identificación prospectiva de los pacientes que responderán al tratamiento puede disminuir significativamente la morbilidad al evitar tratamientos innecesarios en tumores radioresistentes y se pueden intentar de manera más temprana otras alternativas de tratamiento. Sería muy beneficioso poder disponer de un panel de biomarcadores para poder ofrecer un tratamiento oncológico más personalizado.

Existen gran número de biomarcadores estudiados en la literatura, aunque algunos de ellos sólo están publicados en estudios únicos ó con pocos casos. Actualmente el impacto de los biomarcadores predictivos es limitado y no existe un marcador en el tejido, como recomienda el *European Group on Tumour Markers*<sup>310</sup>.

La mayoría de los estudios emplean marcadores por IHQ en las biopsias diagnósticas. Una de las mayores ventajas es que se almacenan durante años en los Departamentos de Anatomía Patológica, lo que permite su estudio de forma accesible a la vez que los datos clínicos. De esta forma se han estudiado gran variedad de marcadores con resultados limitados. La mayoría de los estudios son retrospectivos y de una sola institución. Estos resultados deben interpretarse con precaución por las distintas metodologías utilizadas. Hay mucha variabilidad en las valoraciones patológicas y en los protocolos de tratamiento neoadyuvante, aunque lo más habitual es QT basada en 5-FU y 45-50,4 Gy de irradiación pélvica como en nuestro estudio. Posiblemente los mecanismos de la respuesta al tratamiento sean múltiples y un solo marcador no pueda reflejar esta complejidad. Técnicas como los tissue microarrays pueden minimizar las variaciones<sup>311</sup>. Una técnica alternativa, el cDNA microarray<sup>312</sup>, permite analizar miles de genes y secuencias cortas de ADN. La identificación de diferencias de expresión génicas puede ser de utilidad para predecir la respuesta tumoral. En esta línea está el estudio de *Ghadimi et al*<sup>82</sup>. La limitación de esta técnica es que precisa muestras frescas. Otro problema es que las muestras también incluyen estroma, vasos, linfocitos, etc, que son fuentes potenciales de error. También están descritas técnicas de microdissección con láser para el estudio de las células tumorales y cada vez hay más evidencia de que la matriz extracelular está involucrada en el comportamiento tumoral<sup>313</sup>.

Otras limitaciones se encuentran con la toma de biopsias endoscópicas, ya que no se puede garantizar que el aspecto superficial del tumor pueda reflejar toda su biología. Por otro lado hay evidencia de que la respuesta tumoral a la radiación es dinámica con variaciones en la regulación de genes incluso en etapas tempranas del tratamiento<sup>314</sup>. El problema de tener que realizar biopsias seriadas es que se trata de un procedimiento invasivo y molesto. Por ello, métodos no invasivos de monitorización de la respuesta pueden ser interesantes, como el uso de RM con técnicas de difusión que pueden predecir respuestas tempranas<sup>315</sup>.

La IHQ se usa de manera extendida en el diagnóstico molecular y ofrece la ventaja de su fácil aplicación en la práctica clínica. La subjetividad de los métodos de evaluación es una limitación, sin embargo la valoración semicuantitativa como porcentaje de células con positividad, método utilizado en nuestro estudio, se ha demostrado como muy reproducible entre distintos observadores<sup>316</sup>. Otro motivo de discrepancia es el límite de corte seleccionado para asociar la positividad de los marcadores con la respuesta. También hay variaciones en los sistemas para evaluar la IHQ de cada biomarcador. En muchos estudios se mide un índice de inmunorreactividad (*immunoreactive score*, IRS) que combina el porcentaje de células teñidas (0-4) y la intensidad de la tinción (0-3). Algunos estudios establecen un IRS de 4 para alta expresión, mientras otros lo consideran a partir de 5. Nosotros hemos seleccionado los límites de corte buscando diferencias que nos ayudaran a discriminar pacientes respondedores y no respondedores.

La mayoría de los factores predictivos estudiados se han basado en parámetros histopatológicos<sup>49, 269, 293, 317</sup>. La respuesta al tratamiento está asociada a diversos factores relacionados con el paciente, el tumor y el tratamiento. Los biomarcadores más estudiados en la literatura son seis: p53, EGFR, TS, ki-67, p21 y Bcl-2/BAX. En el panel estudiado por nosotros, hemos encontrado correlación significativa entre la negatividad en la expresión de Bcl-2 ( $p=0,005$ ),  $\beta$ -catenina ( $p=0,027$ ), VEGF ( $p=0,048$ ) y APAF-1 ( $p=0,003$ ) con una buena respuesta (GRT1-2) en el análisis univariante. Con el resto de parámetros moleculares no se ha encontrado correlación.

El p53 es el biomarcador molecular más estudiado. Sin embargo, existen pocos estudios donde se encuentre un valor predictivo al p53. En la mayoría de estudios con IHQ, en línea con el nuestro, no se encontró relación<sup>53, 290</sup>. En el proceso de apoptosis, el papel del p53 está ligado a la presencia de otros genes como ciclina D1 y quinasas ciclin-dependientes (CDK). La ciclina D1, involucrada en la transformación durante el ciclo celular, actúa como un factor proapoptótico, aunque su papel no está probado en el CR<sup>129, 318</sup>. En algunos estudios con secuenciación génica, el genotipo p53 mutado se asocia significativamente a radioresistencia<sup>128, 319</sup>, aunque otros autores no encuentran esta relación<sup>320</sup>. En general la detección de la proteína p53 por IHQ se considera mutante ya que la no mutada (*wild type*) se produce en pequeñas cantidades y tiene una vida media menor. La determinación por ssCP (*single*

*strand conformational polymorphism*) permite la diferenciación entre el gen mutado y no mutado. La presencia del p53 no mutado se relaciona de manera repetida con radio y quimiosensibilidad, mientras que el p53 mutado se asocia a resistencia al tratamiento, aunque en los estudios realizados como hemos comentado no se ha logrado identificar al p53 como predictor<sup>53, 290</sup>. Estos mismos resultados conflictivos se asocian a muchos otros genes regulados por el p53 (BAX, p21, survivin, etc). El análisis directo de la secuencia del gen p53 parece abrir un nuevo campo. *Kandolier et al*<sup>321</sup> (n=60) y *Rebischung et al*<sup>128</sup> (n=86) encontraron que el genotipo p53 mutado se asocia significativamente a radioresistencia. *García Aguilar et al*<sup>100</sup> encontraron que el p53 mutado es un marcador predictivo de no respuesta en combinación con la mutación de KRAS.

*Terzi et al*<sup>322</sup> no encontraron relación entre survivin, p53, ki-67 y la respuesta. *Saw et al*<sup>117</sup> en un estudio de 60 pacientes en el que analizaron por IHQ el p53, el gen DCC y la TS, encontraron asociación sólo entre negatividad de la TS y downstaging. *Chang et al*<sup>132</sup> analizaron por IHQ en 130 casos la expresión del p53, p21, Bcl-2, BAX, ki-67, Ku-70, histona-deacetilasa 1 (HDAC1) y el receptor 4 del glutamato metabotrópico (mGluR4). De todos ellos sólo la expresión de BAX se asoció con la regresión tumoral. La HDAC1 se considera una nueva diana de agentes antitumorales, y la sobreexpresión del mGluR4 se asocia a resistencia al 5-FU en CCR. Sin embargo en este estudio no se ha encontrado relación con la respuesta. *Lin et al*<sup>137</sup> estudiaron p53, p21, p27 y Bcl-2, proteínas importantes en el control del ciclo celular y apoptosis. Se estudian 77 pacientes, aunque sólo 53 son luego evaluados por cirugía radical. El p53 negativo y el p27 positivo fueron predictores de buena respuesta en este estudio. *Kobayashi et al*<sup>204</sup> (n=52), encontraron asociación entre bajos niveles de la COX-2 y buena respuesta. En la expresión de p53 no han encontrado asociación.

*Desai et al*<sup>149</sup> estudiaron varios marcadores celulares por citometría de flujo: p53, ploidía del ADN de la célula tumoral, fracción de fase S y antígenos nucleares de proliferación celular (PCNA). Se analizaron la predicción de la respuesta y la supervivencia libre de enfermedad (n=23). Los tumores PCNA positivos tienen más riesgo de desarrollar metástasis. *Willett et al*<sup>323</sup> sugieren que los marcadores de proliferación incluyendo PCNA se asocian a mejor respuesta a la radiación preoperatoria, aunque en el estudio de *Desai et al*<sup>149</sup> no se encontró esa relación. El estudio sugiere que los tumores p53 negativos tienen menos potencial metastásico.

*Suzuki et al*<sup>309</sup> en un estudio de 93 pacientes analizaron el índice de apoptosis, p53, p21 y ki-67. La positividad del p21 y negatividad del p53 se asociaron a regresión tumoral. Con el ki-67 no encontraron relación.

En nuestro estudio los tumores Bcl-2 negativos están asociados a mejor respuesta tanto en el análisis univariante como multivariante. En la misma línea, *Zlobec et al*<sup>187</sup> evaluaron EGFR, VEGF, p53, Bcl-2 y APAF-1 en 104 pacientes. Los resultados indican que el VEGF y el EGFR son factores predictivos independientes y su análisis combinado es muy predictivo de respuesta completa. En un estudio previo<sup>188</sup>, los mismos autores demuestran no sólo el VEGF sino también Bcl-2 como predictores de respuesta. Los tumores Bcl-2 negativos tienen mayor tasa de respuesta. Ese estudio es el primero en demostrar la correlación entre el VEGF y la pCR en el CR. La positividad simultánea del VEGF y negatividad del EGFR se asoció con ausencia de respuesta en el 94% de los casos. Consideran que estos pacientes deberían ser candidatos a otras modalidades de tratamiento. En ese estudio el VEGF negativo y el EGFR positivo fueron predictivos de pCR. La mejor respuesta a la RT del EGFR positivo puede estar en relación con el tipo de radiación. Otro estudio del mismo grupo<sup>324</sup> intentó identificar pacientes con alto riesgo de mal pronóstico (n=482). Encontraron que la combinación de detección por IHQ de CD8 TILs (*tumour infiltrating lymphocytes*) negativo y sobreexpresión del RHAMM (*receptor of hyaluronic acid-mediated motility*) es predictora de mal pronóstico independiente del estadio de la enfermedad. En particular, pacientes con tumores T1-2 con este perfil desfavorable tienen una supervivencia a 5 años similar a T3-4. Lo mismo sucede con los pacientes N0 en relación a N+. Algunos grupos han identificado la positividad TIL intraepitelial como de buen pronóstico, especialmente en los tumores con estabilidad de microsatélites, posiblemente en relación con una mayor respuesta inmune antitumoral<sup>325</sup>. El RHAMM es una glucoproteína normalmente sobreexpresada en tumores malignos avanzados y se ha identificado como marcador de mal pronóstico en CCR y cáncer de mama<sup>326</sup>. La combinación de la sobreexpresión del RHAMM y el p21 se asocia a muy mal pronóstico en CCR con inestabilidad de microsatélites alta (MSI-H)<sup>327</sup>. En los pacientes N0, la positividad del RHAMM puede ser marcadora de un fenotipo especialmente invasivo.

*Edden et al*<sup>142</sup> publicaron un estudio donde evaluaron varios marcadores de apoptosis (Bcl-2, BAX, APAF-1) así como la expresión de la COX-2 y el VEGF en 152

casos. Encontraron pCR en el 24,5% y T-downstaging en el 60,5%. Al contrario que nuestros hallazgos, la sobreexpresión del APAF-1 se asocia a regresión tumoral, pCR y T-downstaging. No encontraron asociación entre la expresión de Bcl-2 y la respuesta. En contraste la sobreexpresión de la COX-2 y del VEGF se relaciona con menos regresión tumoral y menos T-downstaging, este último en coincidencia con los datos de nuestra serie. Con el resto de parámetros moleculares (p21, p27, p53, BAX) y datos anatómico-clínicos no se encuentra relación. *Huerta et al*<sup>134</sup> evaluaron las diferencias en expresiones de distintos marcadores (Ki-67, cyclin E, p21, p27, p53, survivin, Bcl-2 y BAX) en 38 pacientes con tumores rectales estadios II/III tratados con RQT neoadyuvante. Encontraron diferencias significativas en ki-67, p53, Bcl-2 y BAX, asociadas a pCR. En un estudio similar, *Debucquoy et al*<sup>328</sup> analizaron en 99 pacientes la expresión de EGFR, CA-IX, ki-67, VEGF, COX-2, c-CK18. Encontraron asociación entre la regresión tumoral, la expresión de la COX-2 y la supervivencia. Un 42,4% de los 99 pacientes tuvieron T-downstaging. No hubo diferencias en respuesta entre pacientes tratados con ó sin QT. El VEGF sobreexpresado tuvo relación con mala respuesta aunque no con T-downstaging. Con el resto de los biomarcadores no se encontró relación. En un estudio más reciente del mismo grupo<sup>227</sup> demostraron que la expresión del EGFR y del VEGF y la mutación del KRAS se asocian a una mayor respuesta a la RQT basada en cetuximab. La sobreexpresión del VEGF se asoció a no respuesta, hallazgo relacionado con recientes estudios que sugieren que las vías de acción del EGFR se asocian con la angiogénesis tumoral, especialmente con la estimulación del VEGF<sup>329</sup>. Respecto al KRAS, los pacientes con mutaciones presentaron peor respuesta al cetuximab. En la misma línea que otros estudios, los pacientes con KRAS no mutado y sobreexpresión del EGFR y del VEGF se asociaron significativamente a mayor pCR<sup>330</sup>. *Toiyama et al*<sup>193</sup> encontraron que la expresión génica de 3 marcadores (VEGF, HIF-1 y EGFR) puede predecir la respuesta y la recurrencia sistémica (n=40). Los respondedores tuvieron menores niveles de expresión génica de los tres. La regresión tumoral y el estadio T después de la neoadyuvancia no se relacionan con la recurrencia sistémica aunque la persistencia de N+ es predictor de recurrencia sistémica. La relación entre el EGFR y el VEGF ya se ha establecido previamente. Ambas proteínas comparten vías de activación celular pero parece que contribuyen a la angiogénesis a través de distintos mecanismos, por lo que algunos sugieren que se debería garantizar el bloqueo de ambas proteínas en el tratamiento, aunque los resultados disponibles no son concluyentes. El actual impacto

del VEGFR en los resultados del tratamiento y en el pronóstico es controvertido. *André et al*<sup>331</sup> encontraron una expresión aumentada del VEGFR-1 en el CCR pero sin valor pronóstico. *Bertolini et al*<sup>131</sup> no encontraron asociación entre la expresión del VEGF por IHQ y la pCR en 91 pacientes. En la misma línea está el estudio de *Giralt et al*<sup>186</sup> con 81 casos. Por el contrario *Zlobec et al*<sup>187</sup> si encontraron asociación en una serie de 104 casos.

En los años recientes, las fluoropirimidinas orales (como la capecitabina que se emplea en nuestro protocolo de tratamiento) se usan con frecuencia en el tratamiento del CCR como alternativa al 5-FU endovenoso, con similares resultados oncológicos y de toxicidad. Estudios fase I y II sugieren que la adición de nuevos fármacos al tratamiento con 5-FU es una estrategia posible, pudiendo aumentar las tasas de pCR y por tanto la posibilidad de mejorar los resultados a largo plazo. La combinación de irinotecan y 5-FU en neoadyuvancia parece aumentar las tasas de regresión tumoral hasta el 40%<sup>153, 332</sup>. Sin embargo, en resultados de estudios randomizados recientes la adición de oxaliplatino en la neoadyuvancia ha demostrado un aumento de toxicidad sin beneficio. Su papel de momento se reserva para el tratamiento adyuvante. De forma similar, la adición de fármacos anti-EGFR (cetuximab, panitumumab, gefitinib) ó anti-VEGF (bevacizumab) no parece aumentar de forma significativa las tasas de pCR en estudios fase II<sup>262, 333</sup>, aunque estos agentes parecen tener propiedades radio y quimiosensibilizantes en los modelos preclínicos, pudiendo aportar beneficio en subpoblaciones definidas por biomarcadores. Nuevos agentes antiangiogénicos como los inhibidores de la tirosinquinasa VEGFR y receptores solubles del VEGF, así como agentes disruptores vasculares, inhibidores b-raf, PI3K, etc, han sido aprobados para otros tumores sólidos ó están entrando en estudios clínicos.

Nuestros resultados con el ki-67 están en línea con los estudios de IHQ que analizan los marcadores de proliferación y no han encontrado correlación con la respuesta a RQT<sup>25, 119, 322</sup>. El ki-67 es una proteína nuclear que se expresa en las células proliferativas. Sólo un estudio con 23 pacientes reveló que un índice proliferativo elevado puede diferenciar no respondedores respecto a respondedores completos ó parciales<sup>146</sup>. Más recientemente se considera que el crecimiento del volumen tumoral depende no sólo de la proliferación celular sino también por la tasa de apoptosis. La apoptosis intrínseca (en el tejido antes del tratamiento) se demostró como un factor indicador de menor RL en 1.198 pacientes del estudio holandés *Dutch*

*Total Mesorectal Excision Trial*<sup>152</sup>. La apoptosis está regulada por un complejo mecanismo de balances entre factores activadores como el p53 y factores antiapoptóticos como las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), de la que forma parte survivin, proteína intracelular que bloquea la apoptosis inhibiendo la activación de la caspasa-3 y 7 y regula el ciclo celular en la fase G2/M<sup>334, 335</sup>. Survivin se encuentra presente durante el desarrollo fetal pero su expresión está muy disminuida en tejidos adultos. Se ha descrito su sobreexpresión en diversos tumores, incluyendo CCR<sup>336, 337</sup>. El nivel de apoptosis en tumores rectales se ha propuesto como predictor de respuesta a la RQT preoperatoria<sup>119, 178, 180</sup>, aunque en los estudios clínicos los niveles de survivin no han demostrado esa relación<sup>322</sup>. Otras publicaciones sugieren que la expresión de survivin a nivel nuclear puede ser un marcador más fiable que los niveles citoplasmáticos<sup>338</sup>.

La respuesta al tratamiento está también influenciada por el microambiente tumoral. Uno de los factores que más influyen en la resistencia a la RT es la presencia de áreas de hipoxia en los tumores sólidos. Las células hipóxicas tienen 3 veces más resistencia a la radiación. La acumulación del factor 1 inducido por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ) conlleva la sobreexpresión de genes como GLUT1, CXCR4 y CA-IX. *Guedj et al*<sup>306</sup> encontraron que la expresión del CA-IX es significativamente menor en las biopsias de los respondedores. *Korkelia et al*<sup>339</sup> también han estudiado el factor pronóstico del CA-IX en CR, sin encontrar relación con el tratamiento. *Dietz et al*<sup>340</sup> han investigado la hipoxia tumoral en el CR realizando PET con un nuevo agente, con buenos resultados para predecir el downstaging después del tratamiento neoadyuvante. Del mismo modo, la necrosis tumoral se observó más, de forma significativa, en los no respondedores. No encontraron diferencias en la expresión de GLUT1, ki-67, CXCR4 y la densidad microvascular.

No hemos encontrado trabajos previos con el procolágeno COL11A1 como marcador predictor en el CR. En nuestro estudio no hubo asociación significativa entre la expresión del COL11A1 y la respuesta. Las proteínas de la matriz extracelular tienen un efecto modulador en diversos mecanismos de regulación de la proliferación celular y la apoptosis. La fibronectina es uno de sus principales componentes. Se pensó inicialmente que uno de sus receptores, la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , era un gen supresor tumoral ya que su sobreexpresión inhibe el fenotipo tumorigénico y la capacidad metastásica en varias líneas celulares<sup>341</sup>. Sin embargo este efecto supresor depende de la

presencia de fibronectina. La interacción entre el receptor y la fibronectina puede también influenciar la supervivencia celular modulando la apoptosis (Bcl-2)<sup>342</sup>. En un estudio de 32 pacientes, *Jayne et al*<sup>343</sup> analizaron la relación entre la fibronectina, el receptor ( $\alpha 5\beta 1$  integrina) y la respuesta a la RQT. Encontraron un 16% de pCR. Los buenos respondedores tienden a tener alto contenido de fibronectina en el estroma. No hay diferencias en el contenido de colágeno IV y laminina. El mecanismo de esta asociación no es claro. Puede que sea porque la integrina influye en la diferenciación celular y los tumores mejor diferenciados son más radiosensibles. Una aplicación clínica de estos hallazgos es el desarrollo de un biomarcador altamente específico de invasividad tumoral que detecte de forma coordinada los principales genes implicados, como COL11A1, INHBA y THBS2. Un resultado positivo incluso en estadios tumorales tempranos indicará que la enfermedad ha alcanzado un estado invasivo. El mismo marcador serviría para predecir resistencia a tratamientos neoadyuvantes. La aplicación clínica más significativa sería el desarrollo de fármacos dirigidos a la inhibición de la capacidad metastásica. Como algunos estudios parecen indicar, la folistatina (inhibidora de la activina A) podría servir como un inhibidor de esta capacidad metastásica<sup>344</sup>.

Se han estudiado otras moléculas. *Farkas et al*<sup>291</sup> (n=69) analizaron por IHQ proteínas relacionadas con la citoprotección, supervivencia celular (Hsp 90, Hsp 16.2), y antiapoptosis (p-Akt, GHRH-R, SOUL). Niveles altos de Hsp90 y GHRH-R se relacionan con pobre respuesta. Los inhibidores de Hsp90 se están usando actualmente en estudios preclínicos y clínicos de fases I-III<sup>345, 346</sup>. También antagonistas de GHRH han demostrado producir apoptosis. Un nuevo campo es el uso de células madre para predecir respuesta, en particular CD133. La presencia de estas células en la pieza resecada se asocia a peor pronóstico<sup>347, 348</sup>. En los estudios de *Ghadimi et al*<sup>82</sup>, el factor de transcripción TCF4 (TCF7L2) se encontró sobreexpresado en tumores resistentes. En un estudio posterior del mismo grupo, *Kendziorra et al*<sup>349</sup> han demostrado una radiosensibilización significativa en células de CCR mediante la inhibición del TCF4.

## 8.4 Afectación ganglionar y respuesta

Algunos estudios han demostrado la relación entre una buena respuesta a la RQT y la supervivencia, sugiriendo que los resultados oncológicos tienen más relación con el estadio TNM postoperatorio que con el previo al tratamiento, por lo que el GRT está emergiendo como un factor pronóstico independiente<sup>266, 271, 350</sup>. La correlación con el ypT fortalece esta hipótesis. La incidencia de RL después de RQT se estima sólo en un 2-3%. El GRT es un factor predictivo de RL<sup>266, 269, 350</sup>, aunque su relación con la supervivencia global es más controvertida<sup>293, 351</sup>. *Dhadda et al*<sup>352</sup> (n=158) concluyeron que la clasificación de *Mandard* es un factor pronóstico independiente que predice los resultados a largo plazo. Este score ya ha demostrado ser pronóstico en pacientes después de RQT en cáncer de esófago<sup>64</sup>. Los autores proponen su uso para valorar el tratamiento adyuvante posterior. Los pacientes con GRT1-2 serían aquellos con tumores más sensibles a terapias con 5-FU, mientras que los GRT3-5 ó con ganglios positivos tendrán peor pronóstico y requerirán terapias más intensivas.

Varios estudios han demostrado que los estadios pT y pN así como el CRM son los factores más importantes para determinar RL y supervivencia global y libre de enfermedad. La incidencia de afectación ganglionar después del tratamiento varía. *Read et al*<sup>353</sup> encuentran afectación en 3,4% en T0-1, 23% en T2 y 51.5% en T3-4; otros autores<sup>354</sup> encuentran mayor incidencia en T0-1, 12,1%. En nuestra serie la afectación ganglionar es de 9,4% en T0-1, 22,2% en T2 y 43,7% en T3-4 (tabla VIII). También en línea con nuestro estudio, *Berho et al*<sup>355</sup> (n=86, 60 con estadificación preoperatoria disponible) encontraron correlación entre estadio N postoperatorio y GRT, sugiriendo que la neoadyuvancia debe tener un impacto positivo en la supervivencia global. El TN global disminuye en 38 casos (63,3%) y en 7 (11,6%) aumenta. La pCR fue del 20,4%. El estudio demuestra la baja incidencia de afectación ganglionar (14,2%) en los pacientes respondedores, hallazgos similares a los nuestros, donde la afectación en GRT1-2 fue del 10,8%.

En nuestra serie la media de ganglios estudiados en la pieza quirúrgica fue de 9,4 ( $\pm$  6,04). Aunque el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) estipula un número mínimo de 12 ganglios para un estadiaje correcto, el número de ganglios

aislados en el CR sin tratamiento varía entre 9 y 13<sup>356</sup> y en pacientes con neoadyuvancia la media suele ser menor<sup>356-358</sup>.

## 8.5 Perspectivas futuras

El tratamiento de los pacientes con CR debe ser optimizado de forma continua. Entre los aspectos destacables están la necesidad de control de la calidad de la cirugía y la radiación, la evaluación de las nuevas tecnologías quirúrgicas y de diagnóstico por imagen, la disminución de las secuelas funcionales, la definición de los regímenes terapéuticos de radiación óptimos y los pacientes que no precisen neoadyuvancia, el significado de la pCR y las nuevas estrategias en el tratamiento adyuvante que mejoren la supervivencia. La tendencia actual es crear un perfil tumoral específico, tanto en el aspecto genético como el biológico. El entendimiento de los patrones de comportamiento de cada perfil tumoral y su susceptibilidad a los agentes quimioterápicos nos permitirá una mejor predicción del proceso neoplásico, lo que ayudará a orientar a cada paciente a un curso terapéutico diferente para optimizar los resultados. Respecto a la RT, técnicas novedosas de tratamiento como el ciclo corto continuo, hiperfraccionado y la braquiterapia endorrectal de altas dosis han demostrado mayores porcentajes de respuesta completa con niveles aceptables de toxicidad<sup>359, 360</sup>.

Avances en tecnologías moleculares, análisis mutacional y mapeo genómico nos han llevado a un amplio rango de posibles biomarcadores en el CCR. El desafío actual y futuro es determinar cuáles serán clínicamente útiles y validarlos mediante estudios prospectivos randomizados. Los resultados obtenidos son en muchos casos conflictivos ó contradictorios y virtualmente la totalidad de los marcadores identificados han sido analizados en estudios retrospectivos sin validación con estudios controlados. El *Transvalid-KFO179/GRCSG-Trial* es el primer estudio controlado de biomarcadores en el CR<sup>45</sup>. Es un estudio multicéntrico alemán que intenta de forma prospectiva la validación de marcadores moleculares y clínicos previamente descritos en un protocolo estandarizado.

La cooperación entre patólogos, cirujanos, oncólogos y radiólogos puede contribuir a alcanzar una terapia individualizada en el CR. *Berardi et al*<sup>361</sup> han ideado un modelo clínico-patológico con un índice para calcular la posibilidad de respuesta tumoral. Los pacientes con un bajo índice recibirían un tratamiento más intensivo, mientras que con una posibilidad de buena respuesta se podría plantear un tratamiento quirúrgico local menos agresivo. Desde un punto de vista personal, creemos que los marcadores moleculares serán incorporados a los protocolos de decisión clínica en un futuro no muy lejano. En un escenario potencial, el material de biopsia tanto del tumor como de tejido normal será sometido a análisis genético. Basado en los resultados (predicción de respuesta y de toxicidad), cada paciente se orientará hacia una de las distintas alternativas del tratamiento: pacientes clasificados como “respondedor a tratamiento estándar” serán sometidos a regímenes preoperatorios de baja toxicidad. Por el contrario, pacientes con un perfil de “no respondedor a tratamiento estándar” necesitarán una terapéutica más agresiva. En los pacientes no respondedores y con alto riesgo de toxicidad aguda, la cirugía primaria puede ser una opción. Actualmente el mejor ejemplo de una aplicación comprensiva ha sido desarrollado por *Valentini et al*<sup>362</sup>. Establecen un modelo para predecir RL, metástasis y supervivencia, basado en datos de cinco estudios europeos randomizados. Está disponible on-line (<http://www.predictcancer.org>) y puede ser utilizado como una herramienta complementaria de ayuda en la selección de pacientes para tratamientos específicos y estrategias de seguimiento.



## **9 CONCLUSIONES**



1. Hemos encontrado correlación significativa entre la negatividad de la expresión de BCL-2 ( $p=0,005$ ),  $\beta$ -catenina ( $p=0,027$ ), VEGF ( $p=0,048$ ) y APAF-1 ( $p=0,003$ ) y una mejor respuesta (GRT) al tratamiento neoadyuvante en el análisis univariante. Con el resto de biomarcadores estudiados no se ha encontrado correlación. En la valoración del T-downstaging, hemos encontrado asociación significativa entre la negatividad en la expresión de VEGF ( $p=0,034$ ) y una buena respuesta al tratamiento neoadyuvante en el análisis univariante. Con el resto de biomarcadores estudiados no se ha encontrado asociación.
2. No hemos encontrado asociación significativa entre la edad, intervalo hasta la cirugía, sexo, localización tumoral, CEA, dosis de radioterapia y la respuesta al tratamiento neoadyuvante (GRT y T-downstaging). El grado de diferenciación tumoral si es un marcador predictor de respuesta en el estudio univariante. Los tumores bien diferenciados responden mejor al tratamiento neoadyuvante ( $p<0,001$ ).
3. Existe una correlación significativa entre la afectación ganglionar y la respuesta al tratamiento neoadyuvante ( $p<0,001$ ).
4. En el caso de la respuesta GRT, las variables introducidas en el modelo de regresión logística (análisis multivariante) como significativas han sido el grado de diferenciación tumoral y BCL-2. Con este modelo se puede predecir en un 72% correctamente la respuesta al tratamiento neoadyuvante en el CR localmente avanzado.



## 10 BIBLIOGRAFÍA



1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. GLOBO-CAN 2008, cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 10 (Internet). International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. 2010. Available at: <http://globocan.iarc.fr>.
2. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010; 46:765-781.
3. Cabanes A, Pérez Gómez B, Aragonés N, et al. La situación del cáncer en España, 1975-2006. Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid. Available at: <http://www.isciii.es/htdocs/pdf/epicancer-junio2009.pdf>.
4. Heald RJ, Husband EM, Ryall RD, et al. The mesorectum in rectal cancer surgery; the clue to pelvic recurrence? *Br J Surg* 1982; 69:613-616.
5. Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL, et al. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. *N Eng J Med* 1991; 324:709-715.
6. Fisher B, Wolmark N, Rockette H, Redmond C, et al. Postoperative adjuvant chemotherapy or radiation therapy for rectal cancer: results from NSABP protocol R-01. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80:21-29.
7. Swedish Rectal Cancer Trial Group. Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. *Swedish Rectal Cancer Trial. N Engl J Med* 1997; 336:980-987.
8. Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID, et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Eng J Med* 2001; 345:638-646.
9. Colorectal Cancer Collaborative Group. Adjuvant radiotherapy for rectal cancer: a systematic overview of 8507 patients from 22 randomised trials. *Lancet* 2001; 358:1291-1304.
10. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rodel C, Wittekind C, Fietkau R, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Eng J Med* 2004; 351:1731-1740.
11. Bosset JF, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevic-Jelic L, et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N Eng J Med* 2006; 355:1114-1123.
12. Gerard JP, Conroy T, Bonnetain F, Bouche O, Chapet O, Closon-Dejardin MT, et al. Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: results of FFCD 9203. *J Clin Oncol* 2006; 24:4620-4625.
13. Nelson H, Sargent DJ. Refining multimodal therapy for rectal cancer. *N Eng J Med* 2001; 345:690-692.
14. Glynne-Jones R, Harrison M. Locally advanced rectal cancer: What is the evidence for induction chemoradiation? *Oncologist* 2007; 12:1309-1318.
15. Heald RJ, Karanjia ND. Results of radical surgery for rectal cancer. *World J Surg* 1992; 16:848-857.
16. MacFarlane JK, Ryall RD, Heald RJ. Mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet* 1993; 341:457-460.
17. Alves A, Panis Y, Mathieu P, Manton G, et al. Postoperative mortality and morbidity in French patients undergoing colorectal surgery: results of a prospective multicenter study. *Arch Surg* 2005; 140:278-283 (discussion 284).
18. Lacy AM, Garcia-Valdecasas JC, Delgado S, et al. Laparoscopy assisted colectomy versus open colectomy for treatment of non-metastatic: A randomized trial. *Lancet* 2002; 359:2224-2229.
19. Leung KL, Kwok SP, Lam SC, et al. Laparoscopic resection of rectosigmoid carcinoma: Prospective randomized trial. *Lancet* 2004; 363:1187-1192.
20. Jayne DG, Guillou PJ, Thorpe H, et al. Randomized trial of laparoscopic-assisted resection of colorectal carcinoma: 3 year results of the UK MRC CLASSIC Trial Group. *J Clin Oncol* 2007; 25:3061-3068.
21. Jayne DG, Brown JM, Thorpe H, et al. Bladder and sexual function following resection for rectal cancer in a randomized clinical trial of laparoscopic versus open technique. *Br J Surg* 2005; 92:1124-1132.
22. Milsom JW, de Oliveira O Jr, Trencheva KI, et al. Long-term outcomes of patients undergoing curative laparoscopic surgery for mid and low rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2009; 52:1215-1222.

23. Lery J, Jamali F, Forbes L, et al. Laparoscopic total mesorectal excision (TME) for rectal cancer surgery: Long-term outcomes. *Surg Endosc* 2004; 18:281-289.
24. Kuremsky JG, Tepper JE, McLeod HL. Biomarkers for response to neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 74:673-688.
25. Reerink O, Karrenbeld A, Plukker JT, Verschueren RC, Szabo BG, Sluiter WJ et al. Molecular prognostic factors in locally unresectable rectal cancer treated preoperatively by chemo-radiotherapy. *Anticancer Res* 2004; 24:1217-1221.
26. Wheeler JM, Dodds E, Warren BF, et al. Preoperative chemoradiotherapy and total mesorectal excision surgery for locally advanced rectal cancer: correlation with rectal cancer regression grade. *Dis Colon Rectum* 2004; 47:2025-2031.
27. Ammann K, Kirchmayr W, Klaus A, et al. Impact of neoadjuvant chemoradiation on anal sphincter function in patients with carcinoma of midrectum and low rectum. *Arch Surg* 2003; 138: 257-261.
28. Marijnen CA, van de Velde CJ, Putter H, et al. Impact of short-term preoperative radiotherapy on health-related quality of life and sexual functioning in primary rectal cancer: report of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 2005; 23:1847-1858.
29. Peeters KCMJ, van de Velde CJH, Leer JWH, et al. Late side effects of short-course preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for rectal cancer: increased bowel dysfunction in irradiated patients. *J Clin Oncol* 2005; 23:6199-6206.
30. Birgisson H, Pahlman L, Gunnarsson U, Glimelius B. Occurrence of second cancers in patients treated with radiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:6126-6131.
31. Zeestraten EC, Kuppen PJ, van de Velde CJ, Marijnen CA. Prediction in rectal cancer. *Semin Radiat Oncol*. 2012; 22:175-83. Review.
32. Blomqvist L, Glimelius B. The "good", the "bad", and the "ugly" rectal cancers. *Acta Oncol* 2008; 47:5-8.
33. Martling AL, Holm T, Rutqvist LE, et al. Effect of a surgical training programme on outcome of rectal cancer in the County of Stockholm. Stockholm Colorectal Cancer Study Group, Basingstoke Bowel Cancer Research Project. *Lancet* 2000; 356:93-96.
34. Sebag-Montefiore D, Stephens RJ, Steele R, Monson J, Grieve R, Khanna S, Quirke P, et al. Preoperative versus selective postoperative chemoradiotherapy in patients with rectal cancer (MRC CR07 and NCIC-CTG C016): a multicentre, randomized trial. *Lancet* 2009; 373:811-820.
35. Van Gijn W, Marijnen CA, Nagtegaal ID, et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-Year follow-up of the multicentre, randomised, controlled TME trial. *Lancet Oncol* 2011; 12:575-582.
36. Fleming FJ, Pahlman L, Monson JR. Neoadjuvant therapy in rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2011; 54:901-912.
37. Habr-Gama A, Pérez RO, Nadalin W, et al. Operative versus nonoperative treatment for stage 0 distal rectal cancer following chemoradiation therapy: long-term results. *Ann Surg* 2004; 240:711-717 (discussion 717-718).
38. Habr-Gama A. Assessment and management of the complete clinical response of rectal cancer to chemoradiotherapy. *Colorectal Dis* 2006; 8(suppl3):21-24.
39. Tjandra JJ, Kilkenny JW, Buie WD, et al. Practice parameters for the management of rectal cancer (revised). *Dis Colon Rectum* 2005; 48:411-423.
40. Habr-Gama A, Perez RO, Sao Juliao GP, et al. Nonoperative approaches to rectal cancer. A critical evaluation. *Semin Radiat Oncol* 2011; 21:234-239.
41. Ngan S, Fisher R, Goldstein D. A randomized trial comparing local recurrence (LR) rates between short-course (SC) and long-course (LC) preoperative radiotherapy (RT) for clinical T3 rectal cancer: An intergroup trial (TROG, AGITG, CSSANZ, RACS). *J Clin Oncol* 2010; 28:3509 (abstract).
42. Bujko K, Nowacki MP, Nasierowka-Guttmejer A, et al. Long-term results of a randomized trial comparing preoperative short-course radiotherapy with preoperative conventionally fractionated chemoradiation for rectal cancer. *Br J Surg* 2006; 93:1215-1223.
43. Willett CG, Duda DG, di Te, et al. Efficacy, safety and biomarkers of neoadjuvant bevacizumab, radiation therapy, and fluorouracil in rectal cancer: A multidisciplinary phase II study. *J Clin Oncol* 2009; 27:3020-3026.

44. Hendry JH, West CM. Apoptosis and mitotic cell death: their relative contributions to normal tissue and tumour radiation response. *Int J Radiat Biol* 1997; 71:709-719.
45. Grade M, Wolff HA, Gaedcke J, Ghadimi BM. The molecular basis of chemoradiosensitivity in rectal cancer: implications for personalized therapies. *Langenbecks Arch Surg* 2012; 397:543-555.
46. Zaider M, Hanin L. Tumor control probability in radiation treatment. *Med Phys* 2011; 38:574-583.
47. Drebber U, Madeja M, Odenthal M, Wedemeyer I, Mönig SP, Brabender J, Bollschweiler E, Hölscher AH, Schneider PM, Dienes HP, Vallböhmer D.  $\beta$ -catenin and Her2/neu expression in rectal cancer: association with histomorphological response to neoadjuvant therapy and prognosis. *Int J Colorectal Dis* 2011; 26:1127-1134.
48. Jakob C, Liersch T, Meyer W, Baretton GB, Schwabe W, Hausler P, Kulle B, Becker H, Aust DE. Prognostic value of histologic tumor regression, thymidylate synthase, thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in rectal cancer UICC stage II/III after neoadjuvant chemoradiotherapy. *Am J Surg Pathol* 2006; 30:1169-1174.
49. Rodel C, Marthus P, Papadopoulos T, Fuzesi L, Klimpfinger M, Fietkau R, Liersch T, Hohemberger W, et al. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23:8688-8696.
50. Rosenberg R, Nekarda H, Zimmermann F, Becker K, Lordick F, Hofler H, et al. Histopathological response after preoperative radiochemotherapy in rectal carcinoma is associated with improved overall survival. *J Surg Oncol* 2008; 97:8-13.
51. Moore HG, Gittleman AE, Minsky BD, et al. Rate of pathologic complete response with increased interval between preoperative combined modality therapy and rectal cancer resection. *Dis Colon Rectum* 2004; 47:279-286.
52. Chen Z, Liu Z, Li W, Qu K, Deng X, Varma MG, Fichera A, Pigazzi A, Garcia-Aguilar J. Chromosomal copy number alterations are associated with tumor response to chemoradiation in locally advanced rectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2011; 50:689-699.
53. Smith FM, Reynolds JV, Miller N, Stephens RB, Kennedy MJ. Pathological and molecular predictors of the response of rectal cancer to neoadjuvant radiochemotherapy. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32:55-64.
54. García-Aguilar J, Pollack J, Lee SH, Hernandez de Anda, E, et al. Accuracy of endorectal ultrasound in preoperative staging of rectal tumors. *Dis Colon Rectum* 2002; 45:10-15.
55. Manger T, Stroh C. Accuracy of endorectal ultrasonography in the preoperative staging of rectal cancer. *Tech Coloproctol* 2004; 8 (suppl 1):s14-s15.
56. Lindmark GE, Kraaz WG, Elvin PA, et al. Rectal cancer: Evaluation of staging with endosonography. *Radiology* 1997; 204:533-538.
57. Vanagunas A, Lin DE, Stryker SJ. Accuracy of endoscopic ultrasound for restaging rectal cancer following neoadjuvant chemoradiation therapy. *Am J Gastroenterol* 2004; 99:109-112.
58. Herzog U, von Flue M, Tondelli P, et al. How accurate is endorectal ultrasound in the preoperative staging of rectal cancer? *Dis Colon Rectum* 1993; 36:127-134.
59. Solomon MJ, McLeod RS, Cohen EK, et al. Reliability and validity studies of endoluminal ultrasonography for anorectal disorders. *Dis Colon Rectum* 1994; 37:546-551.
60. Beets-Tan RG, Beets GL. Rectal cancer: review with emphasis on MR imaging. *Radiology* 2004; 232:335-346.
61. Napoleon B, Pujol B, Berger F, et al. Accuracy of endosonography in the staging of rectal cancer treated by radiotherapy. *Br J Surg* 1991; 78:785-788.
62. Meterissian S, Skibber J, Rich T, et al. Patterns of residual disease after preoperative chemoradiation in ultrasound T3 rectal carcinoma. *Ann Surg Oncol* 1994; 1:111-116.
63. Spitz FR, Giacco GG, Hess K, Larry L, Rich TA, Janjan N et al. P53 immunohistochemical staining predicts residual disease after chemoradiation in patients with high-risk rectal cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 3:1685-1690.
64. Mandard A, Dalibard F, Mandard J, et al. Pathological assessment of tumour regression after preoperative chemo/radiotherapy for esophageal carcinoma. *Cancer* 1994; 73:2680-2688.

65. Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis* 1997; 12:19-23.
66. Beddy D, Hyland JM, Winter DC, et al. A simplified tumor regression grade correlates with survival in locally advanced rectal carcinoma treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2008; 15:3471-3477.
67. Ryan R, Gibbons D, Hyland JM, et al. Pathological response following long-course neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Histopathology* 2005; 47:141-146.
68. Berger C, deMuret A, Garaud P, et al. Preoperative radiotherapy (RT) for rectal cancer: predictive factors of tumor downstaging and residual tumor cell density (RTCD): prognostic implications. *Int J Radiat Oncol Phys* 1997; 37:619-627.
69. Francois Y, Nemoz CJ, Baulieux J, et al. Influence of the interval between preoperative radiation therapy and surgery on downstaging and on the rate of sphincter sparing surgery for rectal cancer: the Lyon R90-01 randomized trial. *J Clin Oncol* 1999; 17:2396.
70. Newton KF, Newman W, Hill J. Review of biomarkers in colorectal cancer. *Colorectal Disease* 2011; 14:3-17.
71. Brown G, Richards CJ, Bourne MW, et al. Morphologic predictors of lymph node status in rectal cancer with use of high-spatial-resolution MR imaging with histopathologic comparison. *Radiology* 2003; 227:371-377.
72. Maas M, Nelemans PJ, Valentini V, et al. Long-term outcome in patients with a pathologic complete response after chemoradiation for rectal cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2010; 11:835-844.
73. Winder T, Lenz HJ. Molecular predictive and prognostic markers in colon cancer. *Cancer Treat Rev* 2010; 36:550-556.
74. Leong KJ, Wei W, Tannahill LA, et al. Methylation profiling of rectal cancer identifies novel markers of early-stage disease. *Br J Surg* 2011; 98:724-734.
75. He Y, Van't Veer LJ, Mikolajewka-Hanclich I, et al. PIK3CA mutations predicts local recurrences in rectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2009; 15:6956-6962.
76. Kwon HC, Kim SH, Roh MS, et al. Gene expression profiling in lymph node-positive and lymph node-negative colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2004; 47:141-152.
77. Friederichs J, Rosenberg R, Mages J, et al. Gene expression profiles of different clinical stages of colorectal carcinoma: Toward a molecular genetic understanding of tumor progression. *Int J Colorectal Dis* 2005; 20:391-402.
78. Birkenkamp-Demtroder K, Olesen SH, Sorensen FB, et al. Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut* 2005; 54:374-384.
79. Komuro K, Tada M, Tamoto E, et al. Right- and left-sided colorectal cancers display distinct expression profiles and the anatomical stratification allows a high accuracy prediction of lymph node metastasis. *J Surg Res* 2005; 124: 216-224.
80. Ogawa K, Murayama S, Mori M. Predicting the tumor response to radiotherapy using microarray analysis (Review). *Oncol Rep* 2007; 18:1243-1248.
81. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gassenbeek M, et al. Molecular classification cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999; 286:531-537.
82. Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, Varma S, Simon R, Montagna C et al. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 2005; 23:1826-1838.
83. Sauer R, Fietkau R, Wittekind C, Martus P, Rodel C, Hohenberger W, et al. Adjuvant versus neoadjuvant radio-chemotherapy for locally advanced rectal cancer. A progress report on a phase-III randomized trial (protocol CAO/ARO/AIO-94). *Strahlenther Onkol* 2001; 177:173-181.
84. Liersch T, Grade M, Gaedcke J, Varma S, et al. Preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer: correlation of a gene expression-based response signature with recurrence. *Cancer Genet Cytogenet* 2009; 190:57-65.
85. Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, Varma S, Simon R, Montagna C et al. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 2005; 23:1826-1838.

86. Watanabe T, Komuro Y, Kiyomatsu T, Kanazawa Y, Tanaka J, et al. Prediction of sensitivity of rectal cancer cells in response to preoperative radiotherapy by DNA microarrays analysis of gene expression profiles. *Cancer Res* 2006; 66:3370-3374.
87. Rimkus C, Friederichs J, Boulesteix AL, et al. Microarray-based prediction of tumor response to neoadjuvant radiochemotherapy of patients with locally advanced rectal cancer. *Gastroenterol Hepatol* 2008; 6:53-61.
88. Brettingham-Moore KH, Duong CP, Greenawalt DM, et al. Pretreatment transcriptional profiling for predicting response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2011; 17:3039-3047.
89. Eschrich SA, Pramana J, Zhang H, Zhao H, Boulware D, Lee JH, et al. A gene expression model of intrinsic tumor radiosensitivity: prediction of response and prognosis after chemoradiation. *Int J Radiat Biol Phys* 2009; 75:489-496.
90. Spitzner M, Emons G, Kramer F, Gaedcke J, et al. A gene expression signature for chemoradiosensitivity of colorectal cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 78:1184-1192.
91. Grade M, Gaedcke J, Wangsa D, Varma S, et al. Chromosomal copy number changes of locally advanced rectal cancers treated with preoperative chemoradiotherapy. *Cancer Genet Cytogenet* 2009; 193:19-28.
92. Iacopetta B, Russo A, Bazan V, et al. TP53-CRC Collaborative Group. Functional categories of TP53 mutation in colorectal cancer: Results of an International Collaborative Study. *Ann Oncol* 2006; 17:842-847.
93. Molinari C, Ballardini M, Teodorani N, Giannini M, Zoli W, Emiliani E, Lucci E, Passardi A, Rosetti P, Saragoni L, Guidoboni M, Amadori D, Calistri D. Genomic alterations in rectal tumors and response to neoadjuvant chemoradiotherapy: an exploratory study. *Radiat Oncol* 2011; 6:161.
94. Lievre A, Laurent-Piug P. Genetics: predictive value of KRAS mutations in chemoresistant CRC. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6:306-307.
95. Van Krieken JH, Jung A, Kirchner T, et al. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma: proposal of a European quality assurance program. *Virchows Arch* 2008; 453:417-431.
96. Luna-Pérez P, Segura J, Alvarado I, et al. Specific c-K-ras gene mutations as a tumor-response marker in locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2000; 7:727-731.
97. Bengala C, Bettelli S, Bertolini F, et al. Epidermal growth factor receptor gene copy number, K-ras mutation and pathological response to preoperative cetuximab, 5-FU and radiation therapy in locally advanced rectal cancer. *Ann Oncol* 2009; 20:469-474.
98. Erben P, Ströbel P, Horisberger K, et al. KRAS and BRAF mutations and PTEN expression do not predict efficacy of cetuximab-based chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 15:1032-1038.
99. Gaedcke J, Grade M, Jung K, et al. KRAS and BRAF mutations in patients with rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Radiother Oncol* 2010; 94:76-81.
100. García-Aguilar J, Chen Z, Smith DD, Li W, Madoff RD, Cataldo P, Marcet J, Pastor C. Identification of a Biomarker Profile Associated With Resistance to Neoadjuvant Chemoradiation Therapy in Rectal Cancer. *Ann Surg* 2011; 254:486-493.
101. Villafranca E, Okruzhnov Y, Domínguez MA, et al. Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19:1779-1786.
102. Stoehlmacher J, Goekkurt E, Mogck U, et al. Thymidylate synthase genotypes and tumor regression in stage II-III rectal cancer patients after neoadjuvant fluorouracil-based chemoradiation. *Cancer Lett* 2008; 272:221-225.
103. Balboa E, Durán G, Lamas MJ, et al. Pharmacogenetic analysis in neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer: High incidence of somatic mutations and their relation with response. *Pharmacogenomics* 2010; 11:747-761.
104. Páez D, Salazar J, Paré L, Pertriz L, Targarona E, Del Rio E, Barnadas A, Marcuello E, Baiget M. Pharmacogenetic Study in Rectal Cancer Patients Treated With Preoperative

- Chemoradiotherapy: Polymorphisms in Thymidylate Synthase, Epidermal Growth Factor Receptor, GSTP1, and DNA Repair Genes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 81:1319-1327.
105. Cecchin E, Agostini M, Pacciarelli S, et al. Tumor response is predicted by patient genetic profile in rectal cancer patients treated with neo-adjuvant chemo-radiotherapy. *Pharmacogenomics* 2011; 11:214-226.
  106. Spindler KL, Nielsen JN, Lindebjerg J, Jakobsen A. Germline polymorphisms may act as predictors of response to preoperative chemoradiation in locally advanced T3 rectal tumors. *Dis Colon Rectum* 2007; 50:1363-1369.
  107. Hur H, Kang J, Kim NK, Min BS, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism affects the response to preoperative 5-fluorouracil chemoradiation therapy in patients with rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 81:669-676.
  108. Terrazzino S, Agostini M, Pucciarelli S, et al. A haplotype of the methylenetetrahydrofolate reductase gene predicts tumor response in rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiation. *Pharmacogenetics Genomics* 2006; 16:817-824.
  109. Conradi LC, Bleckmann A, Schrimmer M, et al. Thymidylate synthase as a prognostic biomarker for locally advanced rectal cancer after multimodal treatment. *Ann Surg Oncol* 2011; 18:2442-2452.
  110. Schirmer MA, Nadine Mergler CP, Rave-Frank M, Hermann MK, et al. Acute toxicity of radiochemotherapy in rectal cancer patients: a risk particularly for carriers of the TGFB1 Pro25 variant. *Int J Oncol Biol Phys* 2012; 83:149-157.
  111. Grimminger PP, Brabender J, Warnecke-Eberz U, Narumiya K, Wandhofer C, Drebber U, et al. XRCC1 Gene polymorphism for prediction of response and prognosis in multimodality therapy of patients with locally advanced rectal cancer. *J Surg Res* 2010; 164:e61-e66.
  112. Suh KW, Kim JH, Kim DY, et al. Which gene is a dominant predictor of response during FOLFOX chemotherapy for the treatment of metastatic colorectal cancer, the MTHFR or XRCC1 gene? *Ann Surg Oncol* 2006; 13:1379-1385.
  113. Carlomagno C, Pepe S, D'Armiesto FP, et al. Predictive factors of complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with rectal cancer. *Oncology* 2010; 78:369-375.
  114. Spindler KL, Nielsen JN, Lindebjerg J, et al. Prediction of response to chemoradiation in rectal cancer by a gene polymorphism in the epidermal growth factor receptor promoter region. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 66:500-504.
  115. Zhang W, Gordon M, Press OA, et al. Cyclin D1 and epidermal growth factor polymorphisms associated with survival in patients with advanced colorectal cancer treated with Cetuximab. *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16:475-483.
  116. Shibata D, Reale MA, Lavin P, et al. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Eng J Med* 1996; 335:1727-1732.
  117. Saw RP, Morgan M, Koorey D, Painter D, Findlay M, Stevens G, et al. P53, deleted in colorectal cancer gene, and thymidylate synthase as predictors of histopathologic response and survival in low, locally advanced rectal cancer treated with preoperative adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum* 2003; 46:192-202.
  118. Charara M, Edmonston TB, Burkholder S, Walters R, Anne P, Mitchell E, et al. Microsatellite status and cell cycle associated markers in rectal cancer patients undergoing a combined regimen of 5-FU and CPT-11 chemotherapy and radiotherapy. *Anticancer Res* 2004; 24:3161-3167.
  119. Rau B, Sturm I, Lage H, Berger S, Schneider U, Hauptmann S, et al. Dynamic expression profile of WAF1/CIP1 and Ki-67 predicts survival in rectal carcinoma treated with preoperative radiochemotherapy. *J Clin Oncol* 2003; 21:3391-3401.
  120. Slaby O, Svodoba M, Michalek J, et al. MicroRNAs in colorectal cancer: Translation of molecular biology into clinical application. *Mol Cancer* 2009; 8:102.
  121. Hummel R, Hussej DJ, Haier J. MicroRNAs: Predictors and modifiers of chemo- and radiotherapy in different tumor types. *Eur J Cancer* 2010; 46:298-311.
  122. Della Vittoria Scarpati G, Falcetta F, Carlomagno C, Ubezio P, Marchini S, De Stefano A, Singh VK, D'Incalci M, De Placido S, Pepe S. A Specific miRNA Signature Correlates with Complete Pathological Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012; 83:1113-1119.

123. Svodoba M, Izakovicova HL, Sefr R, et al. Micro-RNAs miR125b and miR137 are frequently upregulated in response to capecitabine chemoradiotherapy of rectal cancer. *Int J Oncol* 2008; 33:541-547.
124. Liotta LA, Ferrari M, Petricoin E. Clinical proteomics: written in blood. *Nature* 2003; 425:905.
125. Allal AS, Kahne T, Reverdin AK, Lippert H, Schlegel W, Reymond MA. Radioresistance-related proteins in rectal cancer. *Proteomics* 2004; 4:2261-2269.
126. Smith FM, Gallagher WM, Fox e, Stephens RB, Rexhepaj E, Petricoin EF III, et al. Combination of SELDI-TOF-MS and data mining provides early-stage response prediction for rectal tumors undergoing multimodal neoadjuvant therapy. *Ann Surg* 2007; 245:259-266.
127. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408:307-310.
128. Rebischung C, Gerard JP, Gayet J, Thomas G, Hamelin R, Laurent-Puig P. Prognostic value of P53 mutations in rectal carcinoma. *Int J Cancer* 2002; 100:131-135.
129. Seicean R, Crisan D, Boers JE, Mocan T, Seicean A, Funari G, Ciuce C. The prognostic role of apoptosis mediators in rectal adenocarcinoma. *Hepatogastroenterology*. 2011; 58:1490-1494.
130. Hilska M, Collan YU, O Laine VJ, et al. The significance of tumor markers for proliferation and apoptosis in predicting survival in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2005; 48:2197-2208.
131. Bertolini F, Bengala C, Losi L, Pagano M, Iachetta F, Dealis C, et al. Prognostic and predictive value of baseline and posttreatment molecular marker expression in locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 68:1455-1461.
132. Chang HJ, Jung KH, Kim DY, Jeong SY, Choi HS, Kim YH, Sohn DK, Yoo BC, Lim SB, Kim DH, Ahn JB, Kim IJ, Kim JM, Yoon WH, Park JG. Bax, a predictive marker for therapeutic response to preoperative chemoradiotherapy in patients with rectal carcinoma. *Hum Pathol* 2005; 36:364-71.
133. Elsaleh H, Robbins P, Joseph D, et al. Can p53 alterations be used to predict tumour response to preoperative chemo-radiotherapy in locally advanced rectal cancer? *Radiother Oncol* 2000; 56:239-244.
134. Huerta S, Hrom J, Gao X, Saha D, Anthony T, Reinhart H, Kapur P. Tissue microarray constructs to predict a response to chemoradiation in rectal cancer. *Dig Liver Dis* 2010; 42:679-84.
135. Luna Perez P, Arriola EL, Cuadra Y, Alvarado I, Quintero A. P53 protein overexpression and response to induction chemoradiation therapy in patients with locally advanced rectal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 1998; 5:203-208.
136. Esposito G, Puciarelli S, Alaggio R, Giacomeli L, Marchiori E, Iaderosa GA, et al. P27kip1 expression is associated with tumor response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2001; 8:311-318.
137. Lin LC, Lee HH, Hwang WS, Li CF, Huang CT, Que J, et al. P53 and p27 as predictors of clinical outcome for rectal cancer receiving neoadjuvant therapy. *Surg Oncol* 2006; 15:211-216.
138. El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994; 54:1169-1174.
139. Waldman T, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature* 1996; 381:713-716.
140. Tian H, Wittmack EK, Jorgensen TJ. P21WAF1/CIP1 antisense therapy radiosensitizes human colon cancer by converting growth arrest to apoptosis. *Cancer Res* 2000; 60:679-684.
141. Fu CG, Tominaga O, Nagawa H, Nita ME, et al. Role of p53 and p21/WAF1 detection in patient selection for preoperative radiotherapy in rectal cancer patients. *Dis Colon Rectum* 1998; 41:68-74.
142. Edden Y, Wexner SD, Berho M. The use of molecular markers as a method to predict the response to neoadjuvant therapy for advanced stage rectal adenocarcinoma. *Colorectal Dis* 2012; 14:555-561.
143. Günther K, Dimmler A, Rödel F, et al. P27 does not predict histopathological response to radiochemotherapy in rectal cancer. *J Surg Res* 2003; 113:179-188.

144. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182:311-322.
145. Brown DC, Gatter KC. Ki-67 protein: The immaculate deception? *Histopathology* 2002; 40:2-11.
146. Kim NK, Park JK, Lee KY, Yang WI, Yun SH, Sung J, et al. P53, Bcl-2 and Ki-67 expression according to tumor response after concurrent chemoradiotherapy for advanced rectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2001; 8:418-424.
147. Jakob C, Liersch T, Meyer W, Becker H, Baretton GB, Aust DE. Predictive value of Ki-67 and p53 in locally advanced rectal cancer: Correlation with thymidilate synthase and histopathological tumor regression after neoadjuvant 5-FU based chemoradiotherapy. *World J Gastroenterol* 2008; 14:1060-1066.
148. Willett CG, Warland G, Cheek R, Coen J, Efid J, Shellito PC, et al. Proliferating cell nuclear antigen and mitotic activity in rectal cancer: predictor of response to preoperative irradiation. *J Clin Oncol* 1994; 12:679-682.
149. Desai GR, Myerson RJ, Hgashikubo R, Bimbaum E, Fleshman J, Fry R, et al. Carcinoma of the rectum. Possible cellular predictors of metastatic potential and response to radiation therapy. *Dis Colon Rectum* 1996; 39:1090-1096.
150. Tannapfel A, Nusslein S, Fietkau R, Katalinic A, Kockerlin F, Wittekind C. Apoptosis, proliferation, bax, bcl-2 and p53 status prior to and after preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 41:585-591.
151. Fluge Ø, Gravdal K, Carlsen E, Vonen B, Kjellevold K, Refsum S, Lilleng R, Eide TJ, Halvorsen TB, Tveit KM, Otte AP, Akslen LA, Dahl O; Norwegian Gastrointestinal Cancer Group. Expression of EZH2 and Ki-67 in colorectal cancer and associations with treatment response and prognosis. *Br J Cancer* 2009; 101:1282-1289.
152. De Bruin EC, Van de Velde CJ, Van de Pas S, Nagtegaal ID, Van Krieken JH, Gosens MJ, et al. Prognostic value of apoptosis in rectal cancer patients of the dutch total mesorectal excision trial: radiotherapy is redundant in intrinsically high-apoptotic tumors. *Clin Cancer Res* 2006; 12:6432-6436.
153. Rodel C, Grabenauer GG, Papadopoulos T, Bigalke M, et al. Apoptosis as a cellular predictor for histopathologic response to neoadjuvant radiochemotherapy in patients with rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 52:294-303.
154. Leers MP, Kolgen W, Bjorklund P, Ramaekers FC, Bjorklund B, Nap M, et al. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol* 1999; 187:567-572.
155. Allal AS, Waelchli L, Bründler MA. Prognostic value of apoptosis-regulating protein expression in anal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9:6489-96.
156. Zhang L, Yu J, Park BH, Kinzler KW, Vogelstein B. Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science* 2000; 290:989-992.
157. Yamaguchi H, Bhalla K, Wang HG. Bax plays a pivotal role in thapsigargin-induced apoptosis of human colon cancer HCT116 cells by controlling Smac/Diablo and Omi/HtrA2 release from mitochondria. *Cancer Res* 2003; 63:1483-1489.
158. Cascinu S, Graziano F, Catalano V, et al. An analysis of p53, BAX, and vascular endothelial growth factor expression in node-positive rectal cancer. Relationships with tumor recurrence and event-free survival of patients treated with adjuvant chemoradiation. *Br J Cancer* 2002; 86:744-749.
159. Guo B, Cao S, Toth K, Azrak RG, Rustum YM. Overexpression of Bax enhances antitumor activity of chemotherapeutic agents in human head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6:718-724.
160. Klump B, Nehis O, Okech T, et al. Molecular lesions in colorectal cancer: impact on prognosis? *Int J Colorectal Dis* 2004; 19:23-42.
161. Bhatavdekar JM, Patel DD, Ghosh N, et al. Coexpression of bcl-2, c-myc, and p53 oncoproteins as prognostic discriminants in patients with colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1997; 40:785-790.
162. Fukunaga-Johnson N, Ryan JJ, Wicha M, Nunez G, Clarke MF. Bcl-2 protects murine erythroleukemia cells from p53-dependent and independent radiation-induced cell death. *Carcinogenesis* 1995; 16:1761-1767.

163. Kudrimoti M, Lee EY, Kang Y, Ahmed M, Mohiuddin M. Genetic markers predictive of response to induction chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancers. *J Ky Med Assoc* 2007; 105:18-22.
164. Rantanen S, Monni O, Joensuu H, Franssila K, Knuutila S. Causes and consequences of BCL2 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2001; 42:1089-1098.
165. Silvestrini R, Veneroni S, Dainone M, et al. The Bcl-2 protein: a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst (Bethesda)* 1994; 86:499-504.
166. Schwander O, Schiedeck TH, Bruch HP, et al. P53 and Bcl-2 as significant predictors of recurrence and survival in rectal cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36:348-536.
167. Rich T, Sinicrope F, Stephens C, et al. Downstaging of T3 rectal cancer after preoperative infusional chemoradiation is correlated with spontaneous apoptosis index and BCL-2 staining (Abstr) *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; 36 (suppl 1:259).
168. Shinoura N, Yoshida Y, Nishimura M, et al. Expression level of Bcl-2 determines anti or proapoptotic function. *Cancer Res* 1999; 59:4119-4128.
169. Miyashita T, Kitada S, Krajewski S, et al. Overexpression of the Bcl-2 protein increases the half-life of p21<sup>Bax</sup>. *J Biol Chem* 1995; 270:26049-26052.
170. Adams JM, Cory S. Apoptosomes: engines of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14:715-720.
171. Zlobec I, Minoo P, Baker K, Haegert D, et al. Loss of APAF-1 expression is associated with tumor progression and adverse prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2007; 43:1101-1107.
172. Paik SS, Jang KS, Song YS, et al. Reduced expression of Apaf-1 in colorectal adenocarcinoma correlates with tumor progression and aggressive phenotype. *Ann Surg Oncol* 2007; 14:3453-3459.
173. Huerta S, Heinzerling JH, Anguiano-Hernandez YM, et al. Modification of genes products involved in resistance to apoptosis in metastatic colon cancer cells: role of Fas, Apaf-1, NFkappaB, IAPs, Smac/DIABLO, and AIF. *J Surg Res* 2007; 142:184-194.
174. Zlobec I, Vuong T, Compton CC. The predictive value of apoptosis protease-activating factor 1 in rectal tumors treated with preoperative, high dose rate brachytherapy. *Cancer* 2006; 106:284-286.
175. Sarela AI, Scott N, Ramsdale J, Markham AF, Guillou PJ. Immunohistochemical detection of the anti-apoptosis protein survivin predicts survival after curative resection of stage II colorectal carcinomas. *Ann Surg Oncol* 2001; 8:305-310.
176. Huerta S, Gao X, Livnigston EH, Kapur P, Sun H, Anthony T. In vitro and in vivo radiosensitization of colorectal cancer HT-29 cells by the smac mimetic JP-1201. *Surgery* 2010; 148:346-353.
177. Tiefenbacher U, Wenz F. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *Strahlenther Onkol* 2001; 177:682-684.
178. Rodel F, Hoffmann J, Grabenbauer GG, et al. High survivin expression is associated with reduced apoptosis in rectal cancer and may predict disease-free survival after preoperative radiochemotherapy and surgical resection. *Strahlenther Onkol* 2002; 178:426-435.
179. Rodel C, Hass J, Groth A, Grabenbauer GG, Sauer R, Rodel F. Spontaneous and radiation-induced apoptosis in colorectal carcinoma cells with different intrinsic radiosensitivities: survivin as a radioresistance factor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 55:1341-1347.
180. Rodel F, Hoffmann J, Distel L, et al. Survivin as a radioresistance factor, and prognostic and therapeutic target for radiotherapy in rectal cancer. *Cancer Res* 2005; 65:4881-4887.
181. Sprenger T, Rodel F, Beissbarth T, Conradi LC, et al. Failure of down-regulation of survivin following neoadjuvant radiochemotherapy in rectal cancer is associated with distant metastases and shortened survival. *Clin Cancer Res* 2011; 17:1623-1631.
182. Rodel F, Reichert S, Sprenger T, Gajpl US, et al. The role of survivin for radiation oncology: moving beyond apoptosis inhibition. *Curr Med Chem* 2011; 18:191-199.
183. Rokoski Jr R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 62:179-213.

184. Lesslie DP, Summy JM, Parikh NU, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 mediates migration on human colorectal carcinoma cells by activation of Src family kinases. *Br J Cancer* 2006; 94:1710-1717.
185. Willett CG, Duda DG, Di Tomaso E, Boucher Y, et al. Complete pathological response to bevacizumab and chemoradiation in advanced rectal cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2007; 4:316-321.
186. Giralt J, Navalpotro B, Hermosilla E, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor and cyclooxygenase-2 in patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy. *Oncology* 2006; 71:312-319.
187. Zlobec I, Vuong T, Compton CC, Lugli A, Michel RP, Hayashi S, Jass JR. Combined analysis of VEGF and EGFR predicts complete tumour response in rectal cancer treated with preoperative radiotherapy. *Br J Cancer* 2008; 98:450-456.
188. Zlobec I, Steele R, Compton CC. VEGF as a predictive marker of rectal tumor response to preoperative radiotherapy. *Cancer* 2005; 104:2517-2521.
189. Schwaab J, Horisberger K, Ströbel P, Bohn B, Gencer D, Kähler G, Kienle P, Post S, Wenz F, Hofmann WK, Hofheinz RD, Erben P. Expression of Transketolase like gene 1 (TKTL1) predicts disease-free survival in patients with locally advanced rectal cancer receiving neoadjuvant chemoradiotherapy. *BMC Cancer* 2011; 11:363.
190. Willett, CG, Duda DG, Xu L, et al. Correlation of blood and physiologic markers with effect of bevacizumab (BV) with chemoradiation therapy in rectal cancer (RC). *J Clin Oncol* 2008; 26:4096 abstract.
191. Dietz DW, Dehdashti F, Grigsby PW, Malyapa RS, Myerson RJ, Picus J, et al. Tumor hypoxia detected by positron emission tomography with 60Cu-ATSM as a predictor of response and survival in patients undergoing neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal carcinoma: a pilot study. *Dis Colon Rectum* 2008; 51:1641-1648.
192. Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:425-437.
193. Toyama Y, Inoue Y, Saigusa S, Okugawa Y, Yokoe T, Tanaka K, Miki C, Kusunoki M. Gene expression profiles of epidermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1 with special reference to local responsiveness to neoadjuvant chemoradiotherapy and disease recurrence after rectal cancer surgery. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2010; 22:272-80.
194. Korkeila E, Jaakkola PM, Syrjänen K, Sundstrom J, Pyrhonen S. Preoperative radiotherapy down regulates the nuclear expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in rectal cancer. *Scand J Gastroenterol* 2009; 45:340-348.
195. Havelund BM, Sørensen FB, Lindebjerg J, Spindler KL, Jakobsen A. Pretreatment HIF-1{alpha} and GLUT-1 expressions do not correlate with outcome after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. *Anticancer Res* 2011; 31:1559-1565.
196. Eckert AW, Lautner MH, Taubert H, et al. Expression of GLUT-1 is a prognostic marker for oral squamous cell carcinoma patients. *Oncol Rep* 2008; 20:1381-1385.
197. Rasheed S, Harris AL, Tekkis PP, Turley H, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha is associated with prognosis. *Br J Cancer* 2009; 100:1666-1673.
198. Brophy S, Sheehan KM, McNamara DA, Deasy J, et al. GLUT-1 expression and response to chemoradiotherapy in rectal cancer. *Int J Cancer* 2009; 125:2778-2782.
199. Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, et al. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* 2001; 158:905-919.
200. Saarnio J, Parkkila S, Parkkila AK, et al. Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation. *Am J Pathol* 1998; 153:279-285.
201. Kapur P. Tailoring treatment of rectal adenocarcinoma: immunohistochemistry for predictive biomarkers. *Anticancer Drugs*. 2011; 22:362-370.
202. Kobayashi H, Uetake H, Higuchi T, et al. JTE-522, a selective COX-2 inhibitor, inhibits growth of pulmonary metastases of colorectal cancer in rats. *BMC Cancer* 2005; 5:26.

203. Smith FM, Reynolds JV, Kay EW, Crotty P, Murphy JO, Hollywood D, et al. COX-2 overexpression in pretreatment biopsies predicts response of rectal cancers to neoadjuvant radiochemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 64:466-472.
204. Kobayashi H, Hashiguchi Y, Ueno H, Shinto E, Kajiwara Y, Mochizuki H. Absence of cyclooxygenase-2 protein expression is a predictor of tumor regression in rectal cancer treated with preoperative short-term chemoradiotherapy. *Dis Colon Rectum* 2007; 50:1354-62.
205. Min BS, Choi YJ, Pyo HR, et al. Cyclooxygenase-2 expression in pretreatment biopsy as a predictor of tumor response after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *Arch Surg* 2008; 143:1091-1097.
206. Petersen C, Petersen S, Milas L, et al. Enhancement of intrinsic tumor cell radiosensitivity induced by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Clin Cancer Res* 2000; 6:2513-2520.
207. Raju U, Ariga H, Dittman K, et al. Inhibition of DNA repair as a mechanism of enhanced radioresponse of head and neck carcinoma cells by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 63:520-528.
208. Fearon ER, Volgenstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:759-767.
209. De Lau W, Barker N, Clevers H. WNT signaling in the normal intestine and colorectal cancer. *Front Biosci* 2007; 12:471-491.
210. Kitisin K, Mishra L. Molecular biology of colorectal cancer: new targets. *Semin Oncol* 2006; 33:S14-S23.
211. Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW. Association of the APC tumor suppression proteins with catenins. *Science* 1993; 262:1734-1737.
212. Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Muller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S, Polakis P. Associations of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 1993; 262:1731-1734.
213. Savas B, Ensari A, Percinel S, Kuzu MA, Bektas M, Cetinkaya H, Kursun N. The significance of beta-catenin, E-cadherin and P-cadherin expressions in neoplastic progression of colorectal mucosa: an immunohistochemical study. *Acta Gastroenterol Belg* 2007; 70:339-344.
214. Gunther K, Brabletz T, Kraus C, Dworak O, Reymond MA, Jung A, Hohenberger W, et al. Predictive value of nuclear beta-catenin expression for the recurrence of distant metastases in rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1998; 41:1256-1261.
215. Fernebro E, Bendahl PO, Dictor M, Persson A, Ferno M, Nilbert M. Immunohistochemical patterns in rectal cancer: application of tissue microarray with prognostic correlations. *Int J Cancer* 2004; 111:921-928.
216. Baldus SE, Monig SP, Huxel S, Landsberg S, Hanisch FG, Engelmann K, et al. MUC1 and beta-catenin are coexpressed at the invasion front of colorectal carcinomas and are both correlated with tumor prognosis. *Clin Cancer Res* 2004; 10:2790-2796.
217. Ochs AM, Wong L, Kakani V, Neerukonda S, Gorske J, Rao A, Riggs M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and HER2/neu in stage II colon cancer and correlation with survival. *Clin Colorectal Cancer* 2004; 4:262-267.
218. Kapitanovic S, Radošević S, Kapitanovic M, Andelinovic S, Ferencic Z, Tavassoli M, et al. The expression of p185 (HER-2/neu) correlates with the stage of the disease and survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1997; 112:1103-1113.
219. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target of therapy. *Oncologist* 1998; 3:237-252.
220. Kruser TJ, Wheeler DL. Mechanisms of resistance to HER family targeting antibodies. *Exp Cell Res* 2010; 316:1083-1100.
221. Klufvinger AM, Ronbinson BW, Quenville NF, Finley RJ, Davis NL. Correlations of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 oncogene product to known prognostic indicators of colorectal cancer. *Sur Oncol* 1992; 1:97-105.
222. Natali PG, Nicotra MR, Bigotti A, Ventura I, Slamon DJ, Fendly BM, Ullrich A. Expression of the p185 encoded by HER2 oncogene in normal and transformed human tissues. *Int J Cancer* 1990; 45:457-461.

223. Giralt J, De las Heras M, Cerezo L, Eraso A, Hermosilla E, Velez D, et al. The expression of epidermal growth factor receptor results in a worse prognosis for patients with rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy: a multicenter, retrospective analysis. *Radiother Oncol* 2005; 74:101-108.
224. Kim JSD, Kim JM, Li S, Yoon WH, Song KS, Kim KH, et al. Epidermal growth factor receptor as a predictor of tumor downstaging in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 66:195-200.
225. Glynne-Jones R, Mawdsley S, Harrison M. Cetuximab and chemoradiation for rectal cancer – is the water getting muddy? *Acta Oncol* 2010; 49:278-286.
226. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Eng J Med* 2007; 357:2040-2048.
227. Grimminger PP, Danenberg P, Dellas K, Arnold D, Rödel C, Machiels JP, Haustermans K, Debucquoy A, Velenik V, Sempoux C, Bracko M, Hölscher AH, Semrau R, Yang D, Danenberg K, Lenz HJ, Vallböhmer D. Biomarkers for Cetuximab-Based Neoadjuvant Radiochemotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17:3469-3477.
228. Jakob C, Aust DE, Meyer W, Baretton GB, Schwabe W, Häusler P, Becker H, Liersch T. Thymidylate synthase, thymidine phosphorylase, dihydropyrimidine dehydrogenase expression, and histological tumour regression after 5-FU-based neo-adjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer. *J Pathol* 2004; 204:562-568.
229. Okonkwo A, Musunuri S, Talamoti M, Benson A III, Small W Jr, Stryker SJ, et al. Molecular markers and prediction of response in chemoradiation in rectal cancer. *Oncol Rep* 2001; 8:497-500.
230. Negri FV, Campanini N, Camisa R, Pucci F, Biu S, Caccon G, et al. Biological predictive factors in rectal cancer treated with preoperative radiotherapy and radiochemotherapy. *Br J Cancer* 2008; 98:143-147.
231. Coy JF, Dressler D, Wilde J, Schubert P. Mutations in the transketolase-like gene TKTL1: clinical implications for neurodegenerative diseases, diabetes and cancer. *Clin Lab* 2005; 51:257-273.
232. Horisberger K, Erben P, Muessle B, Woernle C, Stroebel P, Kaehler G, Wenz F, Hochhaus A, Post S, Willeke F, Hofheinz RD; MARGIT (Mannheimer Arbeitsgruppe für Gastrointestinale Tumoren). Topoisomerase I expression correlates to response to neoadjuvant irinotecan-based chemoradiation in rectal cancer. *Anticancer Drugs*. 2009; 20:519-524.
233. Kim H, Watkinson J, Varadan V, Anastassiou D. Multi-cancer computational analysis reveals invasion-associated variant of desmoplastic reaction involving INHBA, THBS2 and COL11A1. *BMC Medical Genomics* 2010; 3:51.
234. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:392-401.
235. Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P, et al. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med* 2009; 15:68-74.
236. Das P, Skibber JM, Rodriguez-Bigas MA, Feig BW, Chang GJ, Wolff RA, Eng C, Krishnan S, Janjan NA, Crane CH. Predictors of tumor response and downstaging in patients who receive preoperative chemoradiation for rectal cancer. *Cancer* 2007; 109:1750-1755.
237. Van Stiphout RG, Lammering G, Buijsen J, Janssen MH, Gambacorta MA, Slagmolen P, Lambrecht M, Rubello D, Gava M, Giordano A, Postma EO, Haustermans K, Capirci C, Valentini V, Lambin P. Development and external validation of a predictive model for pathological complete response of rectal cancer patients including sequential PET-CT imaging. *Radiother Oncol* 2011; 98:126-133.
238. Patel UB, Taylor F, Blomqvist L, et al. Magnetic resonance imaging-detected tumor response for locally advanced rectal cancer predicts survival outcomes: MERCURY experience. *J Clin Oncol* 2011; 29:3753-3760.
239. Evans J, Patel U, Brown G. Rectal cancer: Primary staging and assessment after chemoradiotherapy. *Semin Radiat Oncol* 2011; 21:169-177.
240. Lambrecht M, Deroose C, Roels S, et al. The use of FDG-PET/CT and diffusion-weighted magnetic resonance imaging for response prediction before, during and after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *Acta Oncol* 2010; 49:956-963.

241. Effiace F, Bottomley A, Coens C, et al. Does a patient's self-reported health-related quality of life predict survival beyond key biomedical data in advanced colorectal cancer? *Eur J Cancer* 2006; 42:42-49.
242. Groenvold M, Petersen MA, Idler E, et al. Psychological distress and fatigue predicted recurrence and survival in primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2007; 105:209-219.
243. Park HC, Janjan NA, Mendoza TR, Lin EH, Vadhan-Raj S, Hundal M, Zhang Y, Delclos ME, Crane CH, Das P, Wang XS, Cleeland CS, Krishnan S. Temporal patterns of fatigue predict pathologic response in patients treated with preoperative chemoradiation therapy for rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 75:775-81.
244. Mendoza TR, Wang XS, Cleeland CS, et al. The rapid assessment of fatigue severity in cancer patients: Use of Brief Fatigue Inventory. *Cancer* 1999; 85:1186-1196.
245. Yoon SM, Kim DY, Kim TH, Jung KH, Chang HJ, Koom WS, Lim SB, Choi HS, Jeong SY, Park JG. Clinical parameters predicting pathologic tumor response after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 69:1167-72.
246. Park YA, Sohn SK, Seong J, Baik SH, Lee KY, Kim NK, Cho CW. Serum CEA as a predictor for the response to preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J Surg Oncol* 2006; 93:145-150.
247. Moreno García V, Cejas P, Blanco Codesido M, Feliu Batlle J, de Castro Carpeño J, Beldaniesta C, Barriuso J, Sánchez JJ, Larrauri J, González-Barón M, Casado E. Prognostic value of carcinoembryonic antigen level in rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24:741-748.
248. Perez RO, São Julião GP, Habr-Gama A, Kiss D, Proscurshim I, Campos FG, Gama-Rodrigues JJ, Ceconello I. The role of carcinoembryogenic antigen in predicting response and survival to neoadjuvant chemoradiotherapy for distal rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2009; 52:1137-1143.
249. Farnault B, Moureau-Zabotto L, de Chaisemartin C, Esterni B, Lelong B, Viret F, Giovannini M, Monges G, Delpero JR, Bories E, Turrini O, Viens P, Resbeut M. Facteurs prédictifs de réponse à la radiochimiothérapie néoadjuvante dans les cancers localement évolués et corrélation de ces facteurs avec la survie. *Cancer Radiother* 2011; 15: 279-286.
250. Sobin LH, Wittekin Ch (eds). *International Union Against Cancer (UICC) (2002) TNM classification of malignant tumors, 6<sup>th</sup> edn. Wiley-Liss, New York.*
251. García Ocaña M, Vázquez F, García Pravia C, Fuentes Martínez N, Menéndez Rodríguez P, Fresno Forcelledo F, Barneo Serra L, Del Amo Iribarren J, Simón Buela L, R de los Toyos J. Characterization of a novel mouse monoclonal antibody, clone 1E8.33, highly specific for human procollagen 11A1, a tumor-associated stromal component. *Int J Oncol* 2012; 40:1447-1454.
252. Quirke P, Durdey P, Dixon MF, Williams NS. Local recurrence of rectal adenocarcinoma due to inadequate surgical resection. Histopathological study of lateral tumour spread and surgical excision. *Lancet* 1986; 2:996-999.
253. Quirke P, Steele R, Monson J, et al. Effect of the plane of surgery achieved on local recurrence in patients with operable rectal cancer: a prospective study using data from the MRC CR07 and NCIC-CTG CO16 randomised clinical trial. *Lancet* 2009; 373:821-828.
254. Wibe A, Redendal PR, Svensson E, et al. Prognostic significance of the circumferential resection margin following total mesorectal excision for rectal cancer. *Br J Surg* 2002; 89:327-334.
255. Benson AB 3rd, Guillem JG, Minsky BD. Have the changes in treatment of rectal cancer made a significant difference in our patients? *Oncology* 2011; 25:1323-1329.
256. Nagtegaal ID, van de Velde CJ, van der Worp E, et al. Macroscopic evaluation of rectal cancer resection specimen: clinical significance of the pathologist quality control. *J Clin Oncol* 2002; 20:1729-1734.
257. Guillou PJ, Quirke P, Thorpe H, et al. Short-term endpoints of conventional versus laparoscopic-assisted surgery in patients with colorectal cancer (MRC CLASICC trial): multicenter, randomized controlled trial. *Lancet* 2005; 365:1718-1726.

258. MERCURY Study Group. Diagnostic accuracy of preoperative magnetic resonance imaging in predicting curative resection of rectal cancer: prospective observational study. *BMJ* 2006; 333:779.
259. MERCURY Study Group. Extramural depth of tumor invasion at thin-section MR in patients with rectal cancer: results of the MERCURY study. *Radiology* 2007; 243:132-139.
260. Taylor FG, Quirke P, Heald RJ, et al. Preoperative high-resolution magnetic resonance imaging can identify good prognosis stage I, II, and III rectal cancer best managed by surgery alone: a prospective, multicenter, European study. *Ann Surg* 2011; 253:711-719.
261. Valentini V, Aristei C, Glimelius B, et al. Multidisciplinary rectal cancer management: 2nd European cancer consensus conference (EURECA-CC2). *Radiother Oncol* 2009; 92:148-163.
262. Machiels JP, Sempoux C, Scalliet P, Coche JC, Humblet Y, Van Cutsem E, et al. Phase I/II study of preoperative cetuximab, capecitabine and external beam radiotherapy in patients with rectal cancer. *Ann Oncol* 2007; 18:738-744.
263. Braendengen M, Tveit KM, Berglund A, et al. Randomized phase III trial comparing preoperative radiotherapy with chemoradiotherapy in nonresectable rectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26:3686-3694.
264. Lawrence TS, Blackstock AW, McGinn C. The mechanism of action of radiosensitization of conventional chemotherapeutic agents. *Semin Radiat Oncol* 2003; 13:13-21.
265. Ptok H, Meyer F, Steinert R, Vieth M, et al. No prognostic impact of isolated lymphovascular invasion after radical resection of rectal cancer – results of a multicenter observational study. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22:749-756.
266. Losi L, Luppi G, Gavioli M, Iachetta F, Bertolini F, et al. Prognostic value of Dworak grade of regression (GR) in patients with rectal carcinoma treated with preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21:645-651.
267. Suárez J, Vera R, Balen E, et al. Pathologic response assessed by Mandard grade is a better prognostic factor than downstaging for disease-free survival after preoperative radiochemotherapy for advanced rectal cancer. *Colorectal Dis* 2008; 10:563-568.
268. Tsujinaka S, Kawamura YJ, Konishi F, et al. Long-term efficacy of preoperative radiotherapy for locally advanced low rectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23:67-76.
269. García Aguilár J, Hernández de Anda E, Sirivongs P, Lee Sh, Madoff RD, Rothenberger DA. A pathologic complete response to preoperative chemoradiation is associated with lower local recurrence and improved survival in rectal cancer patients in patients treated by mesorectal excision. *Dis Colon Rectum* 2003; 46:298-304.
270. Habr-Gama A, Perez RO, Nadalin W, et al. Long-term results of preoperative chemoradiation for distal rectal cancer correlation between final stage and survival. *J Gastrointest Surg* 2005; 9:90-99. Discussion 99-101.
271. Vecchio FM, Valentini V, Minsky BD, et al. The relationship of pathological tumor regression (TRG) and outcomes after preoperative therapy in rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 62:752-760.
272. Capirci C, Valentini V, Cionini L, et al. Prognostic value of pathologic complete response after neoadjuvant therapy in locally advanced rectal cancer: long-term analysis of 566 ypCR patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 72:99-107.
273. Bujko K, Glynne-Jones R, Bujko M. Does adjuvant fluoropyrimidine-based chemotherapy provide a benefit for patients with resected rectal cancer who have already received neoadjuvant radiochemotherapy? A systematic review of randomized trials. *Ann Oncol* 2010; 21:1743-1750.
274. Fernández Martos C, Pericay C, Aparicio J, et al. Phase II, randomized study of concomitant chemoradiotherapy followed by surgery and adjuvant capecitabine plus oxliplatin (CAPOX) compared with induction CAPOX followed by concomitant chemoradiotherapy and surgery in magnetic resonance imaging-defined, locally advanced rectal cancer: Grupo de cancer de recto 3 study. *J Clin Oncol* 2010; 28:859-865.
275. Lezoche E, Guerrieri M, Paganini AM, Baldarelli M, et al. Long-term results in patients with T2-3 N0 distal rectal cancer undergoing radiotherapy before transanal endoscopic microsurgery. *Br J Surg* 2005; 92:1546-1562.

276. Ruo L, Guillem JG, Minsky BD, Quan SH, et al. Preoperative radiation with or without chemotherapy and full thickness transanal excision for selected T2 and T3 distal rectal cancers. *Int J Colorectal Dis* 2002; 17:54-58.
277. Garcia-Aguilar J, Shi Q, Thomas CR, et al. A phase II trial of neoadjuvant chemoradiation and local excision for T2N0 rectal cancer: preliminary results of the ACOSOG Z6041 trial. *Ann Surg Oncol* 2012; 19:384-391.
278. Tytherleigh MG, Ng VV, Pitthankal AA, Wilson MJ, Farouk R. Preoperative staging of rectal cancer by magnetic resonance imaging remains an imprecise tool. *ANZ J Surg* 2008; 78:194-198.
279. Hiotis SP, Weber SM, Cohen AM, et al. Assessing the predictive value of clinical complete response to neoadjuvant therapy for rectal cancer: an analysis of 488 patients. *J Am Coll Surg* 2002; 194:131-135.
280. Smith FM, Waldron D, Winter DC. Rectum-conserving surgery in the era of chemoradiotherapy. *Br J Surg* 2010; 97:1752-1764.
281. Huh JW, Park YA, Jung EJ, Lee KY, et al. Accuracy of endorectal ultrasonography and computed tomography for restaging rectal cancer after preoperative chemoradiation. *J Am Coll Surg* 2008; 207:7-12.
282. Guillem JG, Chessin DB, Shia J, et al. Clinical examination following preoperative chemoradiation for rectal cancer is not a reliable surrogate end point. *J Clin Oncol* 2005; 23:3475-3479.
283. Kuo LJ, Chern MC, Tsou MH, et al. Interpretation of magnetic resonance imaging for locally advanced rectal carcinoma after preoperative chemoradiation therapy. *Dis Colon Rectum* 2005; 48:23-28.
284. Kuo LJ, Chiou JF, Tai CJ, et al. Can we predict pathologic complete response before surgery for locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiation therapy? *Int J Colorectal Dis* 2012; 27:613-621.
285. Bipat S, Glas AS, Slors FJ, et al. Rectal cancer: local staging and assessment of lymph node involvement with endoluminal US, CT, and MR imaging – a meta analysis. *Radiology* 2004; 232:773-783.
286. Kwk H, Bissett IP, Hill GL. Preoperative staging of rectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2000; 15:9-20.
287. Capirci C, Rampin L, Erba PA, Galeotti F, Crepaldi G, Banti E, Gava M, Fanti S, Mariani G, Muzzio PC, Rubello D. Sequential FDG-PET/CT reliably predicts response of locally advanced rectal cancer to neo-adjuvant chemo-radiation therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007; 34:1583-1593.
288. Cascini GL, Avallone A, Delrio P, et al. 18F-FDG PET is an early predictor of pathologic tumor response to preoperative radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer. *J Nucl Med* 2006; 47:1241-1248.
289. Janjan NA, Khoo VS, Abbruzzese J, et al. Tumor downstaging and sphincter preservation with preoperative chemoradiation in locally advanced rectal cancer: The M.D. Anderson Cancer Center experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 44:1027-1038.
290. Qiu H, Sirivongs P, Rothenberger DA, Garcia-Aguilar J. Molecular prognostic factors in rectal cancer treated by radiation and surgery. *Dis Colon Rectum* 2000; 43:451-459.
291. Farkas R, Pozsgai E, Schally AV, et al. Possible predictors of histopathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; 138:387-395.
292. Kalady MF, de Campos-Lobato LF, Stocchi L, Geisler DP, Dietz D, Lavery IC, Fazio VW. Predictive factors of pathologic complete response after neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. *Ann Surg* 2009; 250:582-589.
293. Janjan NA, Crane C, Feig BW, et al. Improved overall survival among responders to preoperative chemoradiation for locally advanced rectal cancer. *Am J Clin Oncol* 2001; 24:107-112.
294. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:979-994.

295. Lee JH, Kim SH, Kim JG, Cho HM, Shim BY. Preoperative Chemoradiotherapy (CRT) Followed by Laparoscopic Surgery for Rectal Cancer: Predictors of the Tumor Response and the Long-Term Oncologic Outcomes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 81:431-438.
296. Park YA, Lee KY, Kim NK, et al. Prognostic effect of preoperative change of serum carcinoembryonic antigen level: a useful tool for detection of systemic recurrence in rectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2006; 13:645-650.
297. Larsen SG, Wiig JN, Dueland S, et al. Prognostic factors after preoperative irradiation and surgery for locally advanced rectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 2008; 34:410-417.
298. Ishihara S, Watanabe T, Kiyomatsu T, Yasuda K, Nagawa H. Prognostic significance of response to preoperative radiotherapy, lymph node metastasis, and CEA level in patients undergoing total mesorectal excision of rectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2010; 25:1417-1425.
299. García Figueiras R, Caro Domínguez P, García Dorrego R, Vázquez Martín A, Gómez Caamaño A. Factores pronósticos e imagen funcional del cáncer de recto. *Radiología* 2012; 54:45-58.
300. Padhani AR, Liu G, Koh DM, Chenevert TL, et al. Diffusion weighted magnetic resonance imaging as a cancer biomarker: consensus and recommendations. *Neoplasia* 2009; 11:102-125.
301. Padhani AR, Koh DM. Diffusion MR imaging for monitoring of treatment response- *Magn Reson Imaging Clin N Am* 2011; 19:181-209.
302. Manning HC, Merchant NB, Foutch AC, Virostko JM, et al. Molecular imaging of therapeutic response to epidermal growth factor receptor blockade in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14:7413-7422.
303. Padhani AR. Multiparametric imaging of tumor response to therapy. *Radiology* 2010; 256:348-364.
304. Kobayashi H, Longmire MR, Ogawa M, et al. Multiplexed imaging in cancer diagnosis: applications and future advances. *Lancet Oncol* 2010; 11:589-595.
305. Jung SH, Heo SH, Kim JW, Jeong YY, Shin SS, Soung MG, Kim HR, Kang HK. Predicting response to neoadjuvant chemoradiation therapy in locally advanced rectal cancer: diffusion-weighted 3 Tesla MR imaging. *J Magn Reson Imaging* 2012; 35:110-116.
306. Guedj N, Bretagnol F, Rautou PE, Deschamps L, Cazals-Hatem D, Bedossa P, Panis Y, Couvelard A. Predictors of tumor response after preoperative chemoradiotherapy for rectal adenocarcinomas. *Hum Pathol* 2011; 42:1702-1709.
307. Ratto C, Ricci R, Valentini V, et al. Neoplastic mesorectal microfoci (MMF) following neoadjuvant chemoradiotherapy: clinical and prognostic implications. *Ann Surg Oncol* 2007; 14:853-861.
308. Bouzourene H, Bosman FT, Seelentag W, et al. Importance of tumor regression assessment in predicting the outcome in patients with locally advanced rectal carcinoma who are treated with preoperative radiotherapy. *Cancer* 2002; 94:1121-1130.
309. Suzuki T, Sadahiro S, Fukasawa M, Ishikawa K, Kamijo A, Yasuda S, Makuuchi H, Ohizumi Y, Murayama C. Predictive factors of tumor shrinkage and histological regression in patients who received preoperative radiotherapy for rectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2004; 34:740-746.
310. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, et al. Tumour markers in colorectal cancer: European group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *Eur J Cancer* 2007; 43:1348-1360.
311. Gulman C, O'Grady A. Tissue microarrays: an overview. *Curr Diag Pathol* 2003; 8:149-154.
312. Rew DA. DNA microarray technology in cancer research. *Eur J Surg Oncol*; 2001;27:504-508.
313. Chang JC, Wooten EC, Tsimelzon A, et al. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet* 2003; 362:362-369.
314. Buchholz TA, Stivers DN, Stec J, et al. Global gene expression changes during neoadjuvant chemotherapy for human breast cancer. *J Cancer* 2002; 8:461-468.
315. Hein PA, Kremser C, Judmaier W, et al. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging for monitoring diffusion changes in rectal carcinoma during combined, preoperative chemoradiation: preliminary results of a prospective study. *Eur J Radiol* 2003; 45:214-222.

316. Zlobec I, Terracciano L, Jass JR, Lugli A. Value of staining intensity in the interpretation of immunohistochemistry for tumor markers in colorectal cancer. *Virchows Arch* 2007; 451:763-769.
317. Das P, Skibber JM, Rodríguez Bigas MA, et al. Clinical and pathological predictors of locoregional recurrence, distant metastasis and overall survival in patients treated with chemoradiation and mesorectal excision for rectal cancer. *Am J Clin Oncol* 2006; 29:219-224.
318. Schwandner O, Bruch HP, Broll R. P21, p27, cyclin D1 and p53 in rectal cancer: immunohistology with prognostic significance? *Int J Colorectal Dis* 2002; 17:11-19.
319. Kandolier D, Zwrtek R, Ludwig C, et al. TP53 genotype but not p53 immunohistochemical result predicts response to preoperative short-term radiotherapy in rectal cancer. *Ann Surg* 2002; 235:493-498.
320. Lopez-Crapez E, Bibeau F, Thezenas S, et al. P53 status and response to radiotherapy in rectal cancer: a prospective analysis. *Br J Cancer* 2005; 92:2114-2121.
321. Kandolier D, Zwrtek R, Ludwig C, et al. TP53 genotype but not p53 immunohistochemical result predicts response to preoperative short-term radiotherapy in rectal cancer. *Ann Surg* 2002; 235:493-498.
322. Terzi C, Canda AE, Sagol O, Atila K, Sonmez D, Fuzun M, Gorken IB, Oztop I, Obuz F. Survivin, p53, and Ki-67 as predictors of histopathologic response in locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23:37-45.
323. Willett CG, Warland G, Coen J, Shellito PC, Compton CC. Rectal cancer: the influence of tumor proliferation on response to preoperative irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 32:57-61.
324. Zlobec I, Baker K, Terracciano L, Peter S, et al. Two-marker protein profile predicts prognosis in patients with early rectal cancer. *Br J Cancer* 2008; 99:1712-1717.
325. Baker K, Zlobec I, Tornillo L, et al. Differential significance of tumour infiltrating lymphocytes in sporadic mismatch repair deficient versus proficient colorectal cancers: a potential role for dysregulation of the transforming growth factor-beta pathway. *Eur J Cancer* 2007; 43:624-631.
326. Hamilton SR, Fard SF, Paiwand FF, et al. The hyaluronan receptors CD44 and Rhamm (CD168) form complexes with ERK1, 2 that sustain high basal motility in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2007; 282:16667-16680.
327. Zlobec I, Baker K, Terracciano LM, et al. RHAMM, p21 combined phenotype identifies microsatellite instability-high colorectal cancers with a highly adverse prognosis. *Clin Cancer Res* 2008; 14:3798-3806.
328. Debucquoy A, Goethals L, Libbrecht L, Perneel C, Geboes K, Ectors N, McBride WH, Haustermans K. Molecular and clinico-pathological markers in rectal cancer: a tissue microarray study. *Int J Colorectal Dis* 2009; 24:129-138.
329. Ruzzo A, Graziano F, Canestrani E, Magnani M. Molecular predictors of efficacy to anti-EGFR agents in colorectal cancer patients. *Curr Cancer Drugs Targets* 2010; 10:68-79.
330. Yen LC, Uen YH, Wu DC, Lu CY, Yu FJ, Wu IC, et al. Activating KRAS mutations and overexpression of epidermal growth factor receptor as independent predictors in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *Ann Surg* 2010; 251:254-260.
331. Andre T, Kotelevets L, Vaillant JC, et al. Vegf, Vegf-b, Vegf-c and their receptors KDR, FLT-1 and FLT-4 during the neoplastic progression of human colonic mucosa. *Int J Cancer* 2000; 86:174-181.
332. Willeke F, Horisberger K, Kraus-Tiefenbacher U, et al. A phase II study of capecitabine and irinotecan in combination with concurrent pelvic radiotherapy (Calpri-RT) as neoadjuvant treatment of locally advanced rectal cancer. *Br J Cancer* 2007; 96:912-917.
333. Horisberger K, Treschl A, Mai S, Barreto-Miranda M, Kienle P, Strobel P, et al. Cetuximab in combination with capecitabine, irinotecan and radiotherapy for patients with locally advanced rectal cancer: results of a phase II MARGIT trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 74:1487-1493.
334. Peltenburg LT. Radiosensitivity of tumor cells. *Oncogenes and apoptosis. Q J Nucl Med* 2000; 44:355-364.

335. Shin S, Sung BJ, Cho YS, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 2001; 40:1117-1123.
336. Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 2000; 46:645-650.
337. Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58:5071-5074.
338. Li F, Yang J, Ramnath N, Javie MM, Tan D. Nuclear and/or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance. *Int J Cancer* 2005; 114:509-512.
339. Korkeila E, Talvinen K, Jaakola PM, et al. Expression of carcinoic anhydrase IX suggests poor outcome in rectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 100:874-880.
340. Dietz DW, Dehdashti F, Grigsby PW, et al. Tumor hypoxia detected by positron emission tomography with <sup>60</sup>Cu-ATSM as a predictor of response and survival in patients undergoing neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal carcinoma: a pilot study. *Dis Colon Rectum* 2008; 51:1641-1648.
341. Ruoslahti E. Integrin signaling and matrix assembly. *Tumor Biol* 1996; 17:117-124.
342. Zhang Z, Vuori K, Reed JC, Ruoslahti E. The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:6161-6165.
343. Jayne DG, Heath RM, Dewhurst O, Scott N, Guillou PJ. Extracellular matrix proteins and chemoradiotherapy: alpha5beta1 integrin as a predictive marker in rectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 2002; 28:30-36.
344. Talmadge JE. Follistatin as an inhibitor of experimental metastasis. *Clin Cancer Res* 2008; 14:624-626.
345. Bohonowych JE, Gopal U, Isaacs JS. Hsp90 as a gatekeeper of tumor angiogenesis: clinical promise and potential pitfalls. *J Oncol* 2010; 2010:412985.
346. Kabakov AE, Kudryavstev VA, Gabai VL. Hsp90 inhibitors as promising agents for radiotherapy. *J Mol Med* 2010; 88:241-247.
347. Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, et al. Immunohistochemical features of CD133 expression: Association with resistance to chemoradiotherapy in rectal cancer. *Oncol Rep* 2010; 24:345-350.
348. Yasuda H, Tanaka K, Saigusa S, et al. Elevated CD133, but not VEGF or EGFR, as a predictive marker of distant recurrence after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. *Oncol Rep* 2009; 22:709-717.
349. Kendziorra E, Ahlborn K, Spitzner M, Rave-Frank M, et al. Silencing of the Wnt transcription factor TCF4 sensitizes colorectal cancer cells to (chemo-) radiotherapy. *Carcinogenesis* 2011; 32:1824-1831.
350. Bouzourene H, Bosman FT, Seelentag W, Matter M, Coucke P. Importance of tumor regression assessment in predicting the outcome in patients with locally advanced rectal carcinoma who are treated with preoperative radiotherapy. *Cancer* 2002; 94:1121-1130.
351. Ruo L, Tickoo S, Klimstra DS, et al. Long-term prognostic significance of extent of rectal cancer response to preoperative radiation and chemotherapy. *Ann Surg* 2002; 236:75-81.
352. Dhadda AS, Dickinson P, Zaitoun AM, Gandhi N, Bessell EM. Prognostic importance of Mandard tumour regression grade following pre-operative chemo/radiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Eur J Cancer* 2011; 47:1138-1145.
353. Read TE, Andujar JE, Caushaj PF. Neoadjuvant therapy for rectal cancer: histologic response of the primary tumor predicts nodal status. *Dis Colon Rectum* 2004; 47:825-831.
354. Zmora O, Dasilva GM, Gurland B, et al. Does rectal wall tumor eradication with preoperative chemoradiation permit a change in the preoperative strategy. *Dis Colon Rectum* 2004; 47: 1607-1612.
355. Berho M, Oviedo M, Stone E, Chen C, Noguerras J, Weiss E, Sands D, Wexner S. The correlation between tumour regression grade and lymph node status after chemoradiation in rectal cancer. *Colorectal Disease* 2009; 11:254-258.
356. Beresford M, Glynned-Jones R, Richman P, et al. The reliability of lymph node staging in rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy. *Clin Oncol* 2005; 17:448-455.

357. Wichmann MW, Muller C, Meyer G, et al. Effect of preoperative radiochemotherapy on lymph node retrieval after resection of rectal cancer. *Arch Surg* 2002; 137:206-210.
358. Wheeler JMD, Warren BF, Mortensen NJ, et al. Quantification of histologic regression of rectal cancer after irradiation: a proposal of a modified staging system. *Dis Colon Rectum* 2002; 45:1051-1056.
359. Brooks S, Glynne-Jones R, Novell R, Harrison M, Brown K, Makris A. Short course continuous hyperfractionated, accelerated radiation therapy (CHART) as preoperative treatment for rectal cancer. *Acta Oncol* 2006; 45:1079-1085.
360. Vuong T, Devic S, Podgorsak E. High dose rate endorectal brachytherapy as a neoadjuvant treatment for patients with resectable rectal cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2007; 19:701-705.
361. Berardi R, Mantello G, Scartozzi M, Del Prete S, Luppi G, Martinelli R, et al. Locally advanced rectal cancer patients receiving radio-chemotherapy: a novel clinico-pathologic score correlates with global outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 75:1437-1443.
362. Valentini V, Van Stiphout RG, Lammering G, et al. Nomograms for predicting local recurrence, distant metastases, and overall survival for patients with locally advanced rectal cancer on the basis of European randomized clinical trials. *J Clin Oncol* 2011; 29:3163-3172.



## **11 ANEXOS**



<b>Clasificación clínica TNM del cáncer colorrectal de la International Union Against Cancer (UICC) y American Joint Committee on Cancer (AJCC)</b>		
<b>Estadio</b>	<b>Descripción</b>	
<i>Tumor primario (T)</i>	<i>TX</i>	<i>No puede valorarse el tumor primario</i>
	<i>T0</i>	<i>No existen indicios de tumor primario</i>
	<i>Tis</i>	<i>Carcinoma in situ; intraepitelial ó invasión de la lámina propia</i>
	<i>T1</i>	<i>El tumor invade la submucosa</i>
	<i>T2</i>	<i>El tumor invade la muscularis propia</i>
	<i>T3</i>	<i>El tumor invade a través de la muscularis propia hasta el interior de la subserosa ó de los tejidos pericólicos ó perirrectales no peritonealizados</i>
	<i>T4</i>	<i>El tumor invade directamente otros órganos ó estructuras y/o perfora el peritoneo visceral</i>
<i>Ganglios linfáticos regionales (N)</i>	<i>NX</i>	<i>No pueden valorarse los ganglios linfáticos</i>
	<i>N0</i>	<i>No se han producido metástasis a ganglios linfáticos regionales</i>
	<i>N1</i>	<i>Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales</i>
	<i>N2</i>	<i>Metástasis en <math>\geq 4</math> ganglios linfáticos regionales</i>
<i>Metástasis a distancia (M)</i>	<i>MX</i>	<i>No pueden evaluarse las metástasis a distancia</i>
	<i>M0</i>	<i>No se han producido metástasis a distancia</i>
	<i>M1</i>	<i>Metástasis a distancia</i>

**Anexo 1. Clasificación TNM de la UICC-AJCC (sexta edición).**



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

---

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA  
Y ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚRGICAS